

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA DO AMBIENTE 2016/2017

**Implementação e Validação de um Método Analítico
para a Determinação do Índice de Hidrocarbonetos
Totais do Petróleo (TPH) em Águas Residuais por
Cromatografia Gasosa**

Jorge Duarte Araújo Avidos

Dissertação submetida para obtenção do grau de

MESTRE EM ENGENHARIA DO AMBIENTE

Presidente do Júri: Cidália Maria de Sousa Botelho

(Professor Auxiliar do Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia
da Universidade do Porto)

Orientador académico: Nuno Miguel Ratola Neto

(Investigador do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e
Energia, Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da
Universidade do Porto)

Orientador na empresa: Daniela Sofia Cardoso Marques de Barros Magalhães

(Diretora do laboratório de química, Biogerm, S.A.)

Julho 2017

Agradecimentos

Aos meus pais, porque a eles devo tudo, tudo o que sou hoje, todos os valores que me transmitiram, todo o apoio que me deram ao longo desta caminhada. Por todos os sacrifícios e todas as injeções de motivação. Espero continuar a ser um orgulho e que tenham tanto orgulho quanto eu de mais uma etapa concluída. Todas as palavras são poucas para vos agradecer. Obrigado.

À minha namorada, Sofia, muito obrigado por todo o apoio, acompanhaste-me desde o início e sempre que precisei eras tu quem lá estava. O teu apoio foi fundamental, nunca me deixaste desistir quando era o mais fácil a fazer, incentivaste-me e estiveste sempre ao meu lado para que conseguisse um objetivo pessoal. Obrigado.

À minha família, que aconteça o que acontecer estará sempre lá, será sempre o meu porto de abrigo. Sem vocês e o vosso exemplo não seria quem sou hoje. Obrigado.

Aos amigos, os de sempre e os que conheci na Universidade do Porto, sem vocês não teria sido igual, não se teria tornado tão especial. Tenho a certeza que esta etapa me deu amigos verdadeiros. Aos de sempre, serão para sempre. Obrigado.

À Engenheira Daniela Barros, por tudo, pela oportunidade do estágio curricular de licenciatura, pela oportunidade e por acreditar no meu trabalho, por estar sempre disponível, por ser a minha orientadora. É fantástico trabalhar consigo todos os dias. Obrigado.

Ao professor Nuno Ratola, que me orientou e acompanhou nesta dissertação. Não sabia o que iria encontrar, mas agora só tenho a agradecer todos os conselhos e compreensão. Obrigado por acreditar em mim e no meu trabalho. Obrigado.

Por fim, agradecer à empresa Biogerm, S.A., que proporcionou todo o desenvolvimento prático desta dissertação e me permite aplicar, diariamente, todo o conhecimento adquirido. Obrigado.

O Professor Nuno Miguel Ratola Neto, orientador desta dissertação, é membro integrado do LEPABE – Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia, financiado pelos Projetos (i) POCI-01-0145-FEDER-006939 (Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia, UID/EQU/00511/2013) financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia I.P., (ii) NORTE-01-0145-FEDER-000005 – LEPABE-2-ECO-INNOVATION, financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e Programa Operacional Regional do Norte (NORTE2020)



Resumo

O valor comercial dos produtos provenientes do petróleo é inegável, mas a sua influência como motor de desenvolvimento global traduzida num excessivo consumo tem os seus reveses, como por exemplo a origem de contaminação ambiental com o consequente impacto nocivo em ecossistemas e na saúde humana. Atendendo que os hidrocarbonetos são o principal constituinte do petróleo bruto (crude), torna-se importante a sua monitorização e análise num contexto de uma presença alargada no meio ambiente.

Como tal, nesta dissertação foi desenvolvido e validado um método de análise laboratorial, com recurso à cromatografia gasosa e baseado na Norma ISO-9377, com o principal objetivo centrado na determinação do índice de hidrocarbonetos totais do petróleo (índice TPH - *Total Petroleum Hydrocarbons*) em águas residuais. O TPH é um parâmetro que engloba todos os hidrocarbonetos presentes entre o C₁₀ (n-Decano) e o C₄₀ (n-Tetracontano).

A validação do método foi baseada nos critérios exigidos pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC), à semelhança de todos os métodos implementados nos laboratórios da empresa Biogerm S.A., em cujos laboratórios foram realizados os trabalhos desta dissertação. Nesse sentido, foram realizados estudos para a calibração, a precisão, a exatidão, a incerteza e ainda a aplicação em amostras naturalmente contaminadas, sempre necessárias para provar que o método está apto para a efetiva avaliação de casos reais. Nos estudos da calibração e da precisão foram obtidos resultados concordantes, nomeadamente na precisão, onde a repetibilidade e reprodutibilidade apresentaram um coeficiente de variação inferior a 10%. A exatidão foi calculada através de ensaios de recuperação e de comparação de resultados, obtendo-se uma percentagem de recuperação entre os 90% e os 115%. Já a incerteza relativa obtida, baseada nos estudos de precisão e de exatidão, atinge um valor de 12,5%.

De um modo geral, todos os estudos realizados cumprem valores aceitáveis, verificando-se também uma concordância entre os resultados obtidos com o método validado nas amostras reais e os mesmos ensaios realizados por laboratórios subcontratados, utilizando um método distinto. Assim sendo, o método está apto para a análise do índice TPH em águas residuais, preconizando a sua utilização a outras matrizes aquosas.

Abstract

The commercial value of the oil products is undeniable, but their influence as a driving force of global development, translated in an excessive consumption, has its setbacks, such as the origin of environmental contamination with consequent adverse impact on ecosystems and human health. Given that hydrocarbons are the main constituent of crude oil, it becomes important to perform their monitoring and analysis in the context of an extended presence in environment.

As such, in this dissertation, a method of laboratory analysis developed and validated, using gas chromatography and based on the ISO-9377, with the focus centered on determination of total petroleum hydrocarbon index (TPH) in wastewaters. The TPH is a parameter that includes all hydrocarbons present between C₁₀ (n-Decane) and C₄₀ (n-Tetracontane).

Validation of the method was based on the criteria required by the Portuguese Institute of Accreditation (IPAC), as with all other protocols implemented in the laboratories of the company Biogerm, S.A., on whose laboratories the works of this dissertation were performed. Accordingly, studies were carried out for calibration, precision, accuracy, uncertainty and even the application to naturally contaminated samples, always necessary to prove that the method is fit for the effective evaluation of actual cases. In the calibration and precision results were consistent in all studies. Namely, repeatability and reproducibility have a coefficient of variation of less than 10%. The accuracy was calculated through recovery assays and comparing with external results, obtaining a percentage between 90% and 115%. The uncertainty, obtained based on precision and accuracy, reaches a value of 12.5%.

In general, all studies meet acceptable values, and there is also a concordance between the results obtained with the method validated in real samples and the same tests performed by subcontracted laboratories, using a different method. Therefore, the method is suitable for the analysis of TPH index in wastewater, advocating its use of other aqueous matrices.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo	V
Abstract	VII
Índice	IX
Lista de Anexos	XI
Lista de Figuras	XIII
Lista de Tabelas	XV
Lista de Equações	XVII
Lista de Abreviaturas	XIX
1. Enquadramento e Apresentação do Projeto	1
2. Introdução	3
2.1 Hidrocarbonetos	3
2.1.1. Definição e Formação	3
2.1.2. Identificação de Hidrocarbonetos	4
2.1.3. Produção Industrial e Aplicações	7
2.1.4. Fontes e Problemas Ambientais/Saúde Pública	8
2.1.5. Legislação	11
2.2. Análise dos hidrocarbonetos	13
2.2.1. Colheita e Transporte da Amostra	13
2.2.2. Preservação da Amostra	15
2.2.3. Extração	15
2.2.5. Análise Cromatográfica	17
2.2.5.1 Cromatografia Gasosa	18
3 . Estado da arte	21
4. Método Analítico	27
4.1. Material e Equipamento	27
4.2. Protocolo Laboratorial	29
4.3. Parâmetros de Validação	34
4.3.1 Calibração	35
4.3.2 Precisão	36

4.3.3 Exatidão	37
4.3.4. Incerteza	38
5. Resultados e Discussão	41
5.1. Otimização do Método	43
5.2. Validação do Método	45
5.2.1. Calibração	45
5.2.2. Precisão	47
5.2.2.1. Estudo de repetibilidade	47
5.2.2.2. Estudo de Reprodutibilidade	48
5.2.2.3. Precisão Intermédia	48
5.2.3. Exatidão	49
5.2.4. Incerteza	51
5.2.5. Testes em amostras reais	52
6. Conclusão	56
7. Bibliografia	57

Lista de Anexos

Anexo I - Tabela representativa de hidrocarbonetos, que relaciona o número de átomos de carbono, o seu ponto de ebulição e o estado físico associado

Anexo II - Avaliação quantitativa do risco e comparação entre colunas compactadas e capilares utilizadas em GC

Anexo III - Cromatograma do padrão 1 (concentração mais baixa), 200 mg/L

Anexo IV - Cromatograma do padrão 5 (concentração mais alta), 1000 mg/L

Anexo V - Instruções de trabalho vigentes na Biogerm, S.A.

Anexo VI - Cromatograma de um branco com interferência de picos retidos da amostra analisada anteriormente

Anexo VII - Os cromatogramas apresentados permitem perceber a diferença entre uma amostra de diesel fresca (a vermelho) e após a passagem de algum tempo à temperatura ambiente (a azul)

Anexo VIII - Cromatograma da amostra de água residual proveniente de uma fábrica produtora de produtos automóveis, utilizada no estudo de reprodutibilidade.

Anexo IX - Boletim proveniente do ISEP, com o valor de hidrocarbonetos (TPH) de uma amostra de água residual recolhida na caixa de visitas de uma fábrica

Lista de Figuras

Figura 1 - Ponto de ebulição dos alcanos em função do número de átomos de carbono

Figura 2 - Frações de destilação e respetiva utilização de produtos derivados do petróleo

Figura 3 - Fase da extração líquido-líquido onde se visualizam as duas fases imiscíveis

Figura 4 - Representação esquemática dos principais componentes de um cromatógrafo gasoso

Figura 5 - Esquema de uma coluna compactada (esquerda) e de uma coluna capilar (direita)

Figura 6 - Cromatógrafo Gasoso - Shimadzu GC2010 plus

Figura 7 - Programa de temperatura da coluna cromatográfica

Figura 8 - Fórmula de cálculo para a determinação do índice de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH)

Figura 9 - Cromatograma com a interferência dos picos retidos

Figura 10 - Cromatograma do solvente de extração com o tempo de leitura de 33 minutos

Figura 11 - Estudo da variação dos declives das retas de calibração

Figura 12 - Percentagem de recuperação obtida nas amostras adicionadas com padrão 0,5 mg/L

Figura 13 - Valores comparativos obtidos em cromatografia gasosa na Biogerm e no ISEP através de gravimetria para a análise do índice TPH em duas águas residuais.

Figura 14 - Gráfico comparativo de amostras preservadas e não preservadas

Figura 15 - Comparação do índice de TPH de amostras de águas residuais a montante e a jusante de uma ETAR

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Grupos e sub-grupos de hidrocarbonetos

Tabela 2 - Valores-limite para hidrocarbonetos referidos no Decreto-Lei 236/98

Tabela 3 - Limites máximos de hidrocarbonetos em diversas matrizes

Tabela 4 - Cadeia-de-Custódia do manuseamento de uma amostra

Tabela 5 - Vantagens e desvantagens da cromatografia gasosa

Tabela 6 - Valores referentes às reservas, produção e consumo de petróleo em 2015, por continente

Tabela 7 - Concentração de TPH nas águas superficiais e subterrâneas próximas de um depósito de petróleo na Nigéria.

Tabela 8 - Valores referência para o índice TPH no setor de atividade petrolífera

Tabela 9 - Técnicas laboratoriais e métodos normativos associados à análise dos hidrocarbonetos

Tabela 10 - Métodos de determinação de hidrocarbonetos e limites de deteção

Tabela 11 - Material e equipamento utilizado na análise de TPH nos laboratórios da Biogerm

Tabela 12 - Padrões da reta de calibração para a análise do TPH

Tabela 13 - Parâmetros do injetor do cromatógrafo gasoso

Tabela 14 - Condições de operação do gás de arraste

Tabela 15 - Condições de operação da coluna cromatográfica

Tabela 16 - Condições de operação do detetor

Tabela 17 - Características das instruções de trabalho

Tabela 18 - Processos de avaliação da exatidão de um método analítico

Tabela 19 - Parâmetros de integração definidos no sistema LabSolutions

Tabela 20 - Teste de homogeneidade de variâncias para a reta de calibração

Tabela 21 - Estudo de repetibilidade do padrão 3 (600 mg/L) e de uma amostra de água residual

Tabela 22 - Estudo de reprodutibilidade de amostras de águas residuais

Tabela 23 - Precisão intermédia dos padrões 1, 3 e 5 da reta de calibração

Tabela 24 - Casas decimais definidas na precisão intermédia

Tabela 25 - Comparação dos resultados do índice de hidrocarbonetos em óleo

Tabela 26 - Valor da incerteza associada ao método analítico

Tabela 27 - Casas decimais definidas pela incerteza relativa

Lista de Equações

Equação 1 - Constante de equilíbrio

Equação 2 - Estimativa de variação

Equação 3 - Limite de repetibilidade

Equação 4 - Coeficiente de variação de repetibilidade

Equação 5 - Incerteza combinada

Equação 6 - Incerteza associada à precisão e incerteza associada às recuperações

Equação 7 - Incerteza combinada

Equação 8 - Incerteza expandida para um nível de confiança de 95%

Equação 9 - Incerteza relativa do método de ensaio (%)

Equação 10 - Teste PG

Lista de Abreviaturas

APA - Agência Portuguesa do Ambiente

APETRO - Associação Portuguesa de Empresas Petrolíferas

AQR - Avaliação Quantitativa do Risco

BP - British Petroleum

BTEX - Benzeno, Tolueno, Etileno e Xilenos

°C - Graus Centígrados

EN - Eletronegatividade

ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais

FTIR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformadas de Fourier (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*)

GC - Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

GC-FID - Cromatografia Gasosa - Detetor de Ionização por Chama (*Gas Chromatography - Flame Ionization Detector*)

GC-MS - Cromatografia Gasosa - Espetrómetro de Massa (*Gas Chromatography - Mass Spectrometry*)

IPAC - Instituto Português de Acreditação

ISEP - Instituto Superior de Engenharia do Porto

ISO - Organização Internacional da Padronização (*International Organization of Standardization*)

IT - Instruções de Trabalho

K_D - Constante de Equilíbrio da Extração

LD - Limite de Detecção

LLE - Extração Líquido-Líquido (*Liquid-Liquid Extraction*)

LQ - Limite de Quantificação

m - Metros

mg - Miligramas

ml - Mililitros

MTBE - *Methyl Tert-Butyl Ether*

n.a. - Não Aplicável

NNPC - Corporação Nacional de Petróleo da Nigéria (*Nigeria National Petroleum Corporation*)

PAH - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*)

ppb - Partes por Bilião

QCL-IR - *Quantum Cascade Laser Infrared*

S.A - Sociedade Anónima

SPE - Extração em Fase Sólida (*Solid-Phase Extraction*)

SPME – Micro-extração em Fase Sólida (*Solid-Phase Microextraction*)

TPH - Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (*Total Petroleum Hydrocarbons*)

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (*United States Environmental Protection Agency*)

UV - Ultra-Violeta

VLE - Valor Limite de Emissão

VMA - Valor Máximo Admissível

VP - Valor Paramétrico

[X]A - Concentração Inicial do Solute na Amostra Extraída

[X]B - Concentração Final do Solute no Solvente de Extração

1. Enquadramento e Apresentação do Projeto

Os hidrocarbonetos são compostos químicos presentes em todas as matrizes do meio ambiente, o que aliado às suas características potencialmente tóxicas e cancerígenas os define como dos principais e mais usuais contaminantes nos dias de hoje. A sua monitorização é por isso imperativa, não pode ser realizada apenas tendo em vista medidas de mitigação mas também de prevenção, o que permitirá reduzir os efeitos nocivos quer no meio ambiente quer na saúde pública. Apesar da carga negativa associada à presença de hidrocarbonetos é importante referir que estes são parte crucial da maior fonte de energia do planeta, uma vez que o petróleo bruto, denominado também por crude, é formado essencialmente por este tipo de compostos.

Este é um projeto desenvolvido em ambiente empresarial, nomeadamente no laboratório de química da empresa Biogerm, S.A., que se dedica à análise microbiológica e físico-química na área do ambiente, água e alimentos. Atendendo às necessidades do mercado a empresa decidiu que a determinação do índice de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH, *Total Petroleum Hydrocarbons* na notação em língua inglesa), por cromatografia gasosa, nas águas residuais, seria uma mais-valia significativa e uma diferenciação dos restantes laboratórios, uma vez que esta é uma técnica pouco usual em Portugal, mas bastante necessária para a mencionada monitorização destes contaminantes. O método consiste na análise de todos os hidrocarbonetos, presentes num intervalo delimitado pelo C₁₀ (n-decano) e C₄₀ (n-tetracontano).

O método foi implementado e validado com base na norma formulada pela International Standard Organization (ISO), denominada ISO - 9377 – “Water Quality - Determination of Hydrocarbon Oil Index - Method Using Solvent Extraction and Gas Chromatography”¹, que visa todo o processo de análise da amostra, desde a colheita e preservação, passando pelo tratamento até à obtenção do resultado final. Assim, foi possível obter um procedimento completo e exaustivo, que abarcou a descrição dos protocolos laboratoriais e o cálculo de todos os parâmetros de validação para que no final de chegasse a um método com todas as garantias analíticas para a adequada quantificação do índice TPH nas matrizes em causa.

2. Introdução

2.1 Hidrocarbonetos

2.1.1. Definição e Formação

A química orgânica é a vertente da química que se dedica ao estudo dos compostos constituídos por átomos de carbono, onde se inserem os hidrocarbonetos, que são os compostos orgânicos mais simples conhecidos e tal como o nome indica, são formados apenas por átomos de carbono e hidrogénio. Este tipo de compostos são os principais constituintes do crude ² e dos derivados de petróleo, razão pela qual a sua presença na superfície terrestre seja comum, na forma de contaminante e de recurso económico.

A formação do crude dá-se a uma grande profundidade e sob condições de pressão e temperaturas muito elevadas, apenas atingidas no interior da Terra. O processo de formação inicia-se com a sedimentação de matéria orgânica no solo, seguido de um processo designado por diagénese, que consiste na degradação bioquímica dos detritos por parte dos microorganismos (bactérias, fungos), que resulta numa fração insolúvel de matéria orgânica retida nas rochas e denominada por querogénio. ² Este composto é considerado uma macromolécula tridimensional constituída por anéis aromáticos ligados a cadeias alifáticas lineares ou ramificadas. ² Através de sucessões geológicas, a profundidade da rocha onde o querogénio está armazenado aumenta, o que se reflete num aumento da temperatura e pressão provocando a libertação deste composto sob a forma de crude e gás (metano-CH₄), processo denominado por catagénese e caracterizado pelo intervalo de temperatura entre os 50 e os 150°C. ² A metagénese é a última fase de transformação da matéria orgânica, transformando-a em gás devido às elevadas temperaturas atingidas. ² É importante referir que a produção do metano, um hidrocarboneto gasoso, é um dado comum em todas as fases do processo de transformação da matéria orgânica. ³

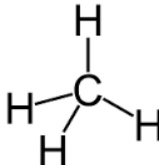
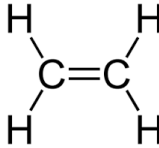
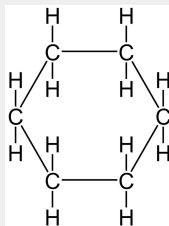
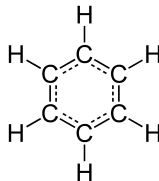
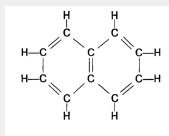
Os requisitos para a formação do crude são a produção, a preservação e acumulação de matéria orgânica. ³ Assim os locais mais usuais para a sua formação e consequentemente para a exploração petrolífera, são os oceanos, devido ao fitoplâncton que se estima responsável pela produção de cerca de 550 biliões de toneladas/ano de matéria orgânica. ²

2.1.2. Identificação de Hidrocarbonetos

Por regra, os hidrocarbonetos dividem-se em dois grupos que se distinguem pela estrutura molecular que apresentam: alifáticos e aromáticos. Os alifáticos apresentam uma estrutura mais simplificada e mais débil ⁴ (linear ou cíclica), onde se enquadram quatro sub-grupos que diferem nas ligações entre átomos. Iniciando pelos alcanos ou hidrocarbonetos saturados (o sub-grupo mais simples dos alifáticos), são constituídos por moléculas que apresentam apenas ligações simples entre os seus átomos de carbono. Um dos exemplos é o metano (CH_4 , ver Tabela 1), o hidrocarboneto mais simples conhecido ⁴, e que respeita a fórmula química geral associada a este grupo, dada por $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$. O grupo dos alcenos é caracterizado pela presença de uma ou mais ligações duplas entre os átomos de carbono que compõe a molécula, tal como se pode verificar na Tabela 1, o eteno (ou etileno) é um exemplo deste tipo de hidrocarbonetos e respeita a fórmula química característica dos alcenos, C_nH_{2n} ⁴. Quando na estrutura molecular é identificada uma ou mais ligações triplas entre os átomos de carbono, como se verifica na molécula de acetileno (Tabela 1), os hidrocarbonetos são reconhecidos como alcinos, que cumprem os requisitos determinados pela fórmula química base, $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}$. ⁴ Por último ainda são identificados como hidrocarbonetos alifáticos os cicloalcanos, que se caracterizam pela sua estrutura molecular ser em forma de anel, como é o exemplo do ciclo-hexano. ⁴

Quanto aos hidrocarbonetos aromáticos, apresentam na sua estrutura molecular pelo menos um anel benzoico ou anel aromático. O benzeno (Tabela 1), é o exemplo de um hidrocarboneto constituído por um único anel aromático, e apresenta-se como um líquido incolor e inflamável e que provém do petróleo e do carvão. ⁵ Neste caso, os átomos de carbono estão conectados por ligações exatamente iguais e estruturados de forma anelar, o que permite à molécula uma maior estabilidade. Este e mais três hidrocarbonetos monoaromáticos podem ser identificados pela sigla BTEX, que representa o benzeno, o tolueno, o etilbenzeno e os xilenos, compostos considerados como os hidrocarbonetos mais comuns nos derivados de petróleo e apresentam uma volatilidade superior aos restantes, característica que se poderá revelar preocupante devido à facilidade de transferência atmosférica para locais vizinhos. ⁴

Tabela 1 - Grupos e sub-grupos de hidrocarbonetos

Grupo	Sub-grupo	Formula Química	Exemplo	Estrutura molecular	Tipo de ligações	Configuração
Alifáticos	Alcanos	C_nH_{2n+2}	Metano		Covalente Simples	Cadeia linear
	Alcenos	C_nH_{2n}	Etileno		Covalente Dupla	Cadeia linear
	Alcinos	C_nH_{2n-2}	Acetileno	$H-C\equiv C-H$	Covalente Tripla	Cadeia linear
	Cicloalcanos	—	Ciclo Hexano		Covalente Simples	Anelar
Aromáticos	Monocíclicos (BTEX)	—	Benzeno		Covalente Dupla	Anelar
	Policíclicos	—	Naftaleno		2 ou mais Covalente Duplas	Anelar

Já os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs - *polycyclic aromatic hydrocarbons* na versão inglesa) são caracterizados pela presença de pelo menos dois anéis aromáticos agregados. A constituição do anel não tem de ser completa, uma vez que qualquer ligação dupla entre carbonos já caracteriza o hidrocarboneto como policíclico. ⁴ Apesar de este grupo não ser o objetivo da dissertação, o que justifica a menor profundidade no seu tratamento, irá ser abordado no capítulo referente aos problemas ambientais e saúde pública, uma vez que os seus efeitos podem ser bastante nocivos.

Os grupos de hidrocarbonetos identificados acima possuem características comuns, entre as quais a baixa ou nula polaridade das moléculas e a fraca solubilidade em solventes polares como a água. ⁶ A polaridade das substâncias caracteriza-se pela proximidade dos valores de electronegatividade dos átomos. Quanto mais próximos, menor será a polaridade dos compostos, como acontece com os átomos de carbono e hidrogénio que têm valores similares, EN=2,55 e EN=2,20, respectivamente. ⁶ Outra das características comuns a todos os grupos é aumento do ponto de ebulição associado ao número de carbonos ⁷ presentes em cada molécula. Isto significa que o peso molecular é responsável pelo aumento do ponto de ebulição dos compostos, tal como pode ser verificado na Figura 1, ⁸ pela distribuição dos pontos de ebulição dos alcanos. No Anexo I encontram-se os diversos pontos de ebulição dos alcanos e o estado físico associados ao número de átomos de carbonos.

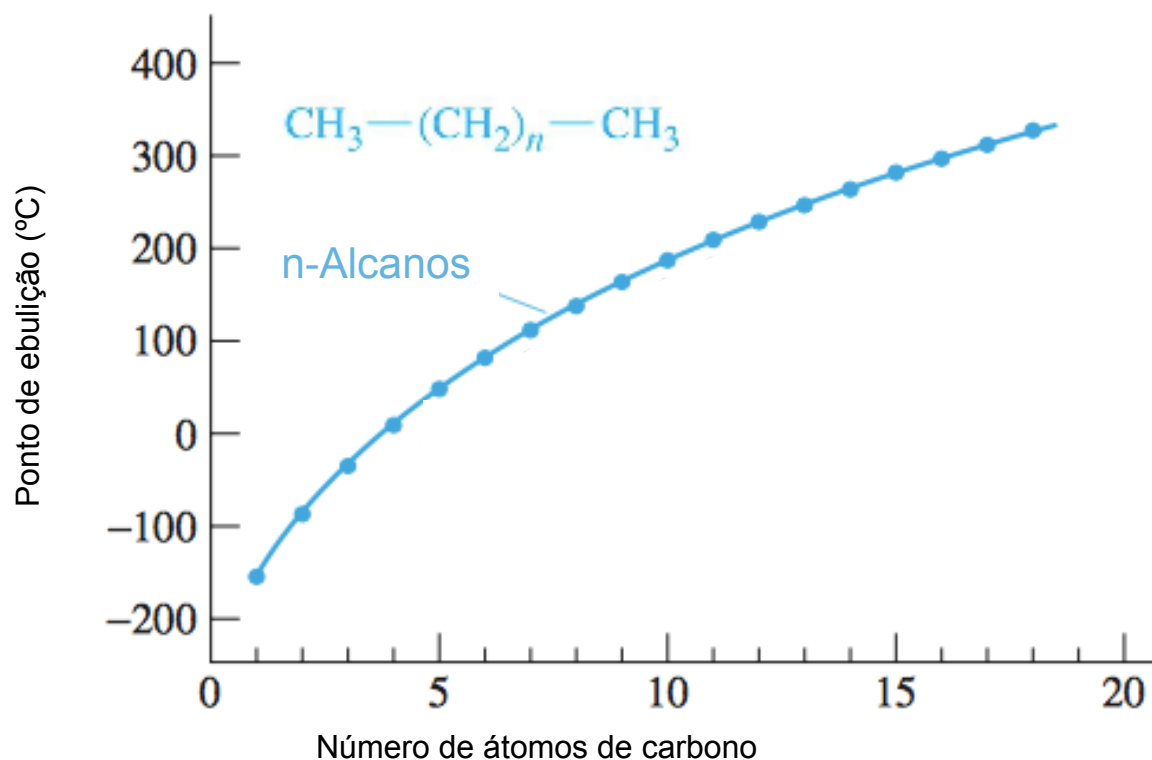


Figura 1 - Ponto de ebulição dos alcanos em função do número de átomos de carbono ⁸

Neste trabalho, todos os hidrocarbonetos presentes entre o C₁₀ e o C₄₀ serão tratados como um todo, isto é, agrupados de modo a obter um parâmetro designado por TPH, que representa os hidrocarbonetos totais do petróleo (na terminologia inglesa, Total Petroleum Hydrocarbons). O TPH é um indicador geral que permite perceber a contaminação de petróleo associada ao local de onde uma amostra é proveniente, motivo

pelo qual não são apresentados individualmente, isto é, só faz sentido uma análise mais seletiva se o TPH for significativo, ⁹ ou se forem conhecidas consequências características de um determinado composto.

2.1.3. Produção Industrial e Aplicações

O petróleo no seu estado mais puro, isto é, o proveniente e encontrado na natureza, não possui qualquer valor de mercado, devido à complexidade da sua composição, onde se encontram hidrocarbonetos no estado gasoso, líquido e sólido, não permitindo a sua utilização direta nas atividades profissionais.

Para que seja possível atingir produtos comerciais com bastante valor, é necessário processar o petróleo bruto (crude). A valorização do petróleo dá-se nas refinarias, local onde é sujeito a um processo de destilação, que permite a separação dos seus componentes de forma a criar produtos com uma matriz menos complexa, passíveis de serem introduzidos no mercado ou que necessitem de um posterior processo aditivo direcionado às necessidades do consumidor.

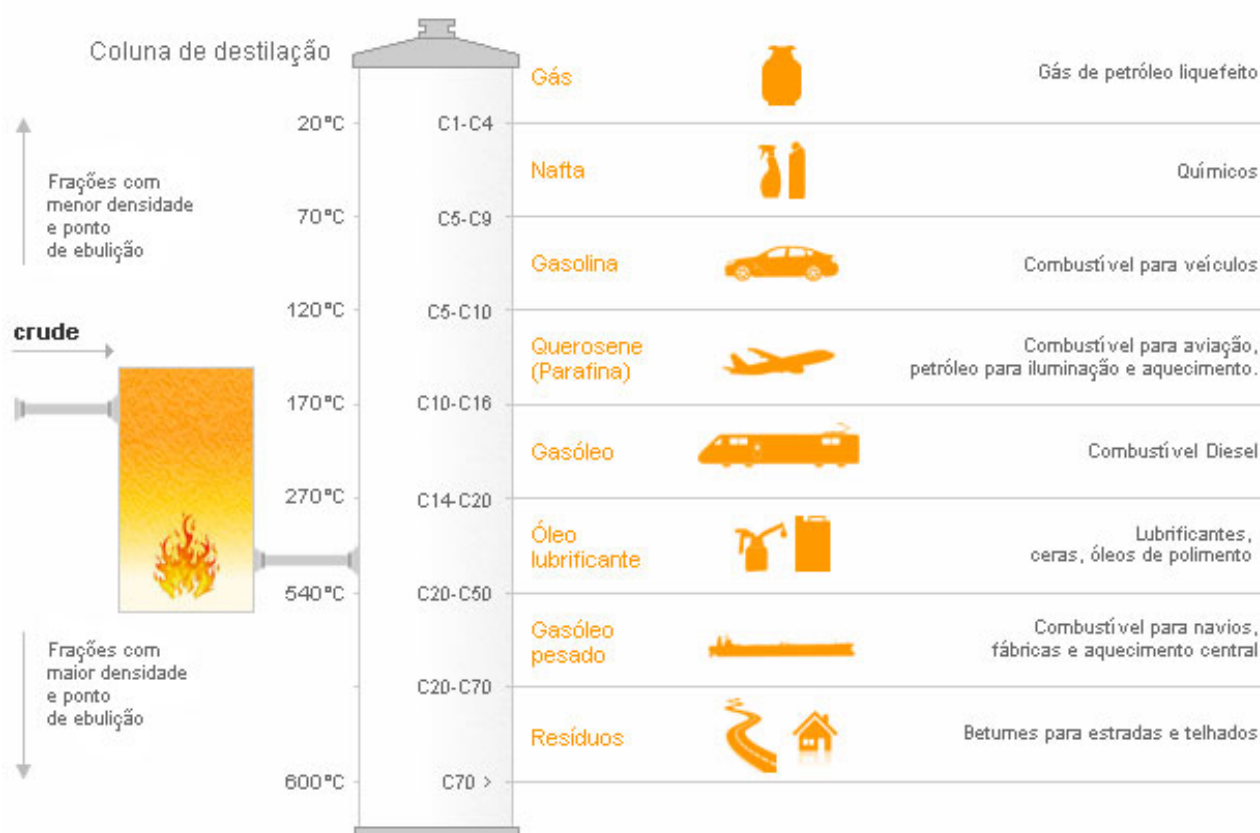


Figura 2 - Frações de destilação e respetiva utilização de produtos derivados do petróleo ¹⁰

Tal como pode ser observado na Figura 2, ¹⁰ a destilação é um processo que se baseia no aquecimento do crude, que separa os componentes através do seu ponto de ebulição e do seu peso molecular.

O valor comercial dos produtos derivados do petróleo é enorme, devido ao facto de estes serem transversais a todas as áreas profissionais. O uso do automóvel, reconhecido meio de transporte mais utilizado atualmente, permite perceber a importância e a dependência das sociedades nestes produtos, nomeadamente na gasolina e no gasóleo. Estes criam um mercado onde existem diversos tipos de combustível, uns para melhoria do desempenho e/ou eficiência do motor, outros para aumentar a competitividade do preço por litro, diferindo essencialmente nos aditivos, que são acrescentados num processo posterior à destilação comum.

Enquanto a fração líquida de derivados de petróleo é utilizada em grande escala para os transportes, o uso da fração de gases (nomeadamente o butano e o propano) para aquecimento de água, edifícios e para outras atividades como a cozinha, demonstra que não é apenas profissionalmente que estes produtos são consumidos. Também a nível pessoal se verifica a enorme dependência desta fonte de energia não renovável. O metano é o principal constituinte do gás natural, também utilizado nos edifícios, todavia o seu aproveitamento nas Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) é um fator que merece referência. A decomposição da matéria orgânica operada pelas bactérias nitrificantes libertam este tipo de gás, que ao ser aproveitado permite a produção de energia elétrica por cogeração e a diminuição das emissões gasosas e dos efeitos negativos associados a este hidrocarboneto.

Com base na Figura 2 é possível concluir que a versatilidade dos produtos derivados do petróleo é grande, podendo ser utilizados na indústria química, na indústria automóvel, na indústria dos transportes e até mesmo na construção civil. No entanto não é possível satisfazer as necessidades de todas as indústrias com um só produto, pelo que é indispensável conhecer o derivado produzido a cada temperatura de ebulição e posteriormente encaminhá-lo para o ramo de atividade que mais valor lhe confere.

2.1.4. Fontes e Problemas Ambientais/Saúde Pública

Os hidrocarbonetos são compostos que apresentam um risco para o meio ambiente e para a saúde pública. A queima de combustíveis fósseis é um tema bastante debatido e atual, defendendo-se cada vez mais as energias limpas e a diminuição de emissões gasosas, precisamente pelas consequências devastadoras associadas ao meio

ambiente e os perigos para a saúde humana. As matrizes recetoras de hidrocarbonetos podem ser o solo, o ar e o meio aquático. Apesar da baixa solubilidade em geral (Hexano - 0,014g/100g de água) ⁶ dos hidrocarbonetos, uma pequena quantidade é suficiente para causar efeitos nocivos em grande escala, devido às suas características químicas. As contaminações de hidrocarbonetos são frequentes, uma vez que o uso do petróleo é um fator comum a quase todas as atividades antropogénicas, que se apresentam como a maior fonte de contaminação do meio ambiente, apesar dos processos de origem natural também terem uma contribuição sensível.

As contaminações dos recursos hídricos são verificadas essencialmente no oceano, mais concretamente pelos derrames de petróleo associados ao seu processamento, ¹¹ provocando desde logo a destruição de habitats, levando à morte de milhares de espécies marinhas, bem como diversos problemas ao nível da saúde pública, ao atingir a costa e expor a população a águas contaminadas. Os derrames associados ao processamento do petróleo bruto podem acontecer nas várias fases do processo, nomeadamente nas condutas, na carga e descarga dos navios petrolíferos, nas necessárias descargas operacionais e ainda no transporte ¹¹, com os tão mediáticos acidentes com petroleiros, capazes de criar imagens verdadeiramente impressionantes. Já a exposição da população pode acontecer por inalação ou contacto com a pele, tendo sido identificadas irritações ao nível dos olhos e membranas, dores de cabeça, vómitos, náuseas e também algumas dificuldades de respiração. ¹¹ A contaminação marinha não se resigna apenas à água, pois muitos hidrocarbonetos depositam-se nos fundos oceânicos, onde poderão ser absorvidos pelos peixes e ervas marítimas, que posteriormente poderão servir de alimento às populações, criando, também, mais uma possibilidade de exposição da população a estes contaminantes. ¹¹

Quando a matriz recetora de hidrocarbonetos é o solo, as principais fontes de contaminação são os resíduos provenientes das explorações petrolíferas e essencialmente os derrames que se verificam de produtos derivados do petróleo usados no dia-a-dia, tais como a gasolina e o gasóleo. A contaminação do solo consiste na agregação dos hidrocarbonetos às suas partículas, que poderão afetar não só a área onde ocorreu a descarga, como também as populações vizinhas, pois estas partículas podem ser transportadas para outros locais através do processo de erosão, que consiste no transporte, lento, de partículas sólidas através de processos naturais como o vento e a chuva. Na inalação e na ingestão, as partículas contaminadas são absorvidas juntamente com o ar e através dos alimentos, respetivamente, caso estes tenham sido cultivados num local onde as mesmas se depositaram. Por outro lado, a volatilidade do sub-grupo BTEX,

referenciado anteriormente, pode levar à infiltração em edifícios e terrenos agrícolas, criando um fator de exposição contínuo às populações.¹¹

As contaminações ambientais são completadas com as libertações de hidrocarbonetos para a atmosfera, cuja principal fonte é a queima de combustíveis fósseis. Das atividades antropogénicas, a queima destes combustíveis nos motores dos automóveis são as mais enfatizadas. Todavia, não são desprezíveis as libertações que acontecem durante a exploração de fontes de petróleo onde são geradas partículas extremamente finas e compostos orgânicos voláteis, como por exemplo sub-grupo BTEX. Os problemas cardio-respiratórios são o efeito mais problemático deste tipo de contaminação.¹¹

Todos os problemas associados à exposição de hidrocarbonetos dependem de quatro fatores essenciais: a concentração de hidrocarbonetos presente, o tempo de exposição a estes compostos, a classe de contaminante existente e ainda a via de contacto com os poluentes.¹¹ O sub-grupo BTEX apresenta uma toxicidade bastante alta, devido às suas características químicas¹² mas também aos seus níveis de exposição, isto é, sendo os hidrocarbonetos mais facilmente encontrados no meio ambiente, torna-os um grupo de elevado risco para a saúde pública. O benzeno será provavelmente o composto mais nocivo, uma vez que apresenta efeitos cancerígenos associados à longa exposição e em casos de contaminação aguda pode levar à morte.¹² Já o tolueno e o etilbenzeno são absorvidos pelo sistema gastrointestinal humano, embora com distintas repercussões. O etilbenzeno possui uma toxicidade baixa, mas quando presente em altas concentrações pode provocar irritação dos olhos e vias respiratórias, bem como lesões nos ouvidos.¹² O tolueno afeta essencialmente o sistema nervoso, embora também provoque alterações no fígado e nos rins. Por último, os xilenos são facilmente absorvidos por inalação, afetando o sistema nervoso e provocando dores de cabeça, tonturas e falta de coordenação muscular.¹²

Quanto aos PAHs, a United State Environmental Protection Agency (USEPA), referencia 16 destes compostos como prioritários,¹³ atendendo às suas características cancerígenas e mutagénicas e à grande produção destes compostos nas atividades antropogénicas que envolvem processos de combustão. Os efeitos associados à curta exposição a estes compostos não estão claramente identificados, contudo foram anotados casos de dificuldade respiratória em pessoas com asma, e trombozes em pessoas com problemas de coração.¹³ A longa exposição a este tipo de produtos provoca um aumento e agravamento dos problemas associados à saúde humana, afetando essencialmente os pulmões e a pele, consoante o modo de contacto com estes

compostos, ¹³ ao mesmo tempo que se verificam os casos de cancro, essencialmente, na presença de misturas de PAHs. Segundo a USEPA, seis PAHs possuem um elevado potencial cancerígeno: benz(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenz(ah)antraceno, e indeno(1,2,3-cd)pireno. ¹³ Um outro problema bastante associado aos PAHs são as mutações genéticas, onde se identificaram, por exemplo, dificuldades no desenvolvimento, baixo peso do feto, parto prematuro e más formações identificadas aquando de uma elevada exposição durante a gravidez, segundo diversos estudos. ¹³

A título de comparação entre os dois grandes grupos de hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos), os últimos apresentam um maior risco, devido à estabilidade da sua molécula, que consequentemente aumenta a sua resistência à deformação. ¹¹

2.1.5. Legislação

Sendo os hidrocarbonetos substâncias que podem ser nocivas para a saúde humana e o meio ambiente, existe a necessidade de um controlo rígido e eficiente. Este é realizado através de decretos-lei, atribuídos a cada tipo de matriz, que possuem valores máximos tabelados, de forma a minimizar os efeitos negativos associados. Em Portugal, foi publicado em Diário da República o Decreto-Lei nº 236/98, no dia 01-08-1998 visando promulgar os requisitos para as águas destinadas a consumo humano, águas para suporte de vida aquícola, águas balneares, águas de rega e ainda para descargas de águas residuais no solo e meios hídricos. ¹⁴

Os limites encontrados no Decreto-Lei referentes a hidrocarbonetos estão descritos na Tabela 2, onde se constata as baixas concentrações que é necessário observar para assegurar a saúde pública e uma preservação dos recursos ambientais ao dispor. No desenvolvimento desta dissertação foram analisados os hidrocarbonetos encontrados no intervalo de C₁₀, n-decano, e C₄₀, n-tetracontano, definidos pela norma ISO-9377, ¹ direcionada à qualidade da água com foco na determinação do índice de hidrocarbonetos totais do petróleo, recorrendo ao método de cromatografia gasosa (GC).

Tabela 2 - Valores-limite para hidrocarbonetos referidos no Decreto-Lei nº 236/98

Tipo de Água	Parâmetro	LD	VMA	Técnica de Análise
Águas de Consumo Humano	Hidrocarbonetos Dissolvidos ou Emulsionados	-	10 ug/L	Espectrometria de absorção molecular-infravermelho
	Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares	-	0,2 ug/L	Cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização de chama e ou espectrometria de massa. Cromatografia líquida com detecção por fluorescência/ultravioleta.
Águas Superficiais	Hidrocarbonetos Dissolvidos ou Emulsionados	0,01 mg/L	-	Espectrometria no infravermelho após extração pelo tetracloreto de carbono.
		0,04 mg/L	-	Gravimetria após extração por meio de éter de petróleo.
	Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares	0,04 ug/L	100 ug/L	Medição da fluorescência por ultravioleta após cromatografia em camada fina. Medição comparativa em relação a uma mistura de controlo constituída por seis substâncias padrão com a mesma concentração
Descargas de Águas Residuais	Hidrocarbonetos Totais	25% VP mg/L	15 mg/L	Espectrometria no infravermelho após extração com solventes adequados. Gravimetria após extração com solventes adequados.
	Hidrocarbonetos Aromáticos Polinucleares	25% VP ug/L	15 mg/L	Cromatografia em fase gasosa. Cromatografia líquida de alta eficiência
Águas Aquícolas	Hidrocarbonetos	-	*	Exame visual e gustativo

LD - limite de detecção; VMA - valor máximo admissível; VP - valor paramétrico

* Os valores de hidrocarbonetos não podem criar um filme na superfície das águas e não podem ser referenciado o sabor a hidrocarboneto aquando da ingestão de produtos pescados.

No Decreto-Lei acima referenciado, o parâmetro que limita os hidrocarbonetos é designado por óleos minerais, com um valor limite de emissão (VLE), de 15 mg/L. ¹⁴ Na Tabela 2 vem referenciado o valor paramétrico (VP), tal como no Decreto-Lei, mas este termo é utilizado nas águas de consumo humano. Para águas residuais o termo utilizado é o VLE. O valor limite de emissão é entendido como uma média mensal e os valores diários nunca poderão exceder o dobro deste VLE. ¹⁴

A legislação associada a hidrocarbonetos não se limita à água. As lamas produzidas em ETARs, ¹⁵ os fertilizantes ¹⁶ provenientes das lamas, os lixiviados ¹⁷

(efluentes de aterros sanitários) e ainda os alimentos ¹⁸ também se encontram referenciados em Decretos-Lei devido à grande possibilidade de conterem hidrocarbonetos, nomeadamente os PAHs. Na Tabela 3 encontram-se os valores máximos admissíveis em cada uma das matrizes e o respetivo Decreto-Lei que os define.

Tabela 3 - Limites máximos de hidrocarbonetos em diversas matrizes

Matriz	Documento Legislador	Parâmetro	VMA
Lamas	Decreto-Lei 276/2009	PAH	6 mg/Kg
Matéria Fertilizante	Decreto-Lei 103/2015	PAH	6 mg/Kg
Lixiviado	Decreto-Lei 183/2009	PAH	100 mg/Kg
Alimentos	Regulamento CE 1881/2006	Benzo(a)pireno*	**

VMA - valor máximo admissível

* O benzo(a)pireno é utilizado como marcador de PAHs cancerígenos

** Os VMA estão atribuídos para cada classe de alimentos

2.2. Análise dos hidrocarbonetos

As análises de amostras não envolvem somente o trabalho de laboratório. O processo de identificação dos locais, da colheita, do transporte e da preservação das amostras são indispensáveis para uma adequada e correta obtenção dos resultados. A análise de hidrocarbonetos não foge à regra, diversificando-se apenas no tipo de análise laboratorial requerida, escolhida consoante o tipo de hidrocarbonetos a identificar. Devido às características químicas dos hidrocarbonetos o tratamento da amostra deve ser realizado assim que possível, de forma a minimizar a sua decomposição e volatilização e consequentemente os potenciais erros associados.

2.2.1. Colheita e Transporte da Amostra

A colheita é o início do processo de análise de uma amostra, e pode ser efetuada por qualquer pessoa conhecedora das medidas a adotar. No entanto, é aconselhável a amostragem por parte de um técnico devidamente qualificado de forma a evitar interferências na futura análise da amostra. O principal objetivo da amostragem é colher o menor volume possível de amostra, que seja suficiente para as análises requeridas e ainda servir como testemunho, ¹⁹ isto é, que possa ser armazenada como parte representativa da amostra. Para uma colheita que garanta o manuseamento correto e a

integridade da amostra, é formulado um modelo chamado Cadeia-de-Custódia (*Chain-of-Custody* na terminologia em língua inglesa), ¹⁹ que pode ser verificado na Tabela 4.

Tabela 4 - Cadeia-de-Custódia do manuseamento de uma amostra

Cadeia-de-Custódia	
Etiquetas da Amostra	Número da Amostra Tipo de Amostra Nome do Coletor Data e Hora da Colheita Local da Colheita Preservação da Amostra
Livro de Campo	Propósito da Colheita Localização do Ponto de Colheita Contacto do Cliente Tipo de Amostra Método de preservação Data de Preservação Hora da Preservação
Registo da Cadeia-de-Custódia	Número da amostra Dia, Hora e Local da Colheita Tipo de Amostra Preservação da Amostra Técnico responsável pela Colheita Técnico responsável pelo Transporte (se necessário)
Requerimento de Análises	Nome do Recetor da Amostra Número da Amostra no Laboratório (Se necessário) Data da Receção Condições da amostra - Fria ou quente - Com ou Sem cor - Homogénea ou Heterogénea Análises requeridas
Entrega das amostras no Laboratório (Preferencialmente as amostras serão entregues no laboratório logo após a colheita, contudo o tempo máximo de entrega não deve exceder os 2 dias)	Verificação do estado e da etiqueta da amostra Introdução da amostra no sistema interno do laboratório Armazenamento da amostra nas temperaturas aconselhadas
Análise	É da responsabilidade do técnico e do responsável do laboratório garantir que a amostra está nas devidas condições para ser analisada Cumprir o protocolo de Qualidade
Emissão dos Resultados	Validação do resultado pelo técnico Validação dos resultados pelo responsável máximo do laboratório (Assinatura do Boletim)

É importante referenciar o transporte da amostra até ao laboratório, dada a sua possível influência no resultado final, caso não seja devidamente executado. Quando a colheita é realizada pela empresa responsável pelas análises o tempo e a temperatura

correta de transporte são assegurados, mas quando é necessário recorrer a empresas de transporte, é essencial anexar os documentos com todas as informações relevantes, de modo a garantir que estes cumprem todos os requisitos necessários.

2.2.2. Preservação da Amostra

A preservação da amostra é um procedimento necessário para garantir que se mantém as características originais da amostra, o que permite minimizar o potencial de volatilização e de biodegradação entre a colheita e o momento da análise.¹⁹ É importante referir que não existe um método totalmente satisfatório para todas as análises, motivo pelo qual a escolha é feita consoante a análise a realizar, para que as interferências sejam negligenciáveis. Alguns métodos de preservação de amostras são os seguintes:

- Controlo do pH;
- Adição de produtos químicos;
- Utilização de recipientes de vidro opaco;
- Refrigeração/Congelação;
- Filtração;

É de salientar que um método de preservação reconhecido para um determinado elemento pode interferir com outro também requisitado,¹⁹ o que torna necessário uma divisão da amostra e um tipo de preservação diferente para cada um deles.

2.2.3. Extração

Este processo tem como principal objetivo extrair da amostra o composto a ser estudado. Algumas das técnicas mais utilizadas são a LLE (extração líquido-líquido), a SPE (extração em fase sólida) e a SPME (microextração em fase sólida),²⁰ e apresentam-se como as mais transversais. Contudo, o conhecimento das propriedades químicas do analito é preponderante (pressão de vapor, solubilidade, peso molecular, dissociação ácida), para a escolha da extração.²⁰

No caso dos hidrocarbonetos, a técnica utilizada é a extração líquido-líquido. Nela encontramos duas fases, obrigatoriamente imiscíveis (Figura 3), que são a amostra líquida onde o analito se encontra dissolvido e o solvente onde se pretende dissolver o analito para futura determinação.²⁰ O solvente de extração tem de possuir um ponto de

ebulição compreendido no intervalo 36 - 69 °C e uma polaridade semelhante à do analito, para que haja uma correta dissolução, respeitando a regra básica da química que um soluto polar se dissolve num solvente polar e um soluto apolar se dissolve num solvente apolar. Neste caso concreto o solvente apolar utilizado será o n-pentano.



Figura 3 - Fase da extração líquido-líquido onde se visualizam as duas fases imiscíveis

A extração líquido-líquido inicia-se com a adição do solvente à amostra, que forma uma camada na superfície e permite a distribuição de forma equitativa do componente entre as fases, avaliada pela constante de equilíbrio química (K_D), dada pela função da concentração inicial do soluto na fase A (amostra) e na concentração final do soluto na fase B (solvente).²⁰

$$K_D = \frac{[X]_B}{[X]_A}$$

Equação 1 - Constante de equilíbrio²⁰

O valor máximo de K_D é 1, que corresponde a uma extração perfeita, onde se consegue a transferência total do analito para o solvente de extração, sendo que a concentração final do analito no solvente ($[X]_B$) tem de ser igual à concentração inicial do analito na amostra ($[X]_A$). No entanto é difícil obter este valor na manipulação da amostra devido às perdas que se verificam.

2.2.5. Análise Cromatográfica

O primeiro cientista a reconhecer a cromatografia como uma técnica analítica eficiente foi M.S. Tswett,²¹ um botânico russo que no início do século XIX, a utilizou para a separação de pigmentos nas plantas. Esta técnica pode ser utilizada em diversas matrizes e nos três estados físicos, isto é, tem a capacidade de analisar amostras gasosas, líquidas e sólidas.²¹

A cromatografia é um processo de separação de componentes, diferenciados pela afinidade que demonstram entre duas fases,²² que se denominam por fase móvel e fase estacionária. Uma das principais características da cromatografia é o facto de ser extremamente versátil. Apesar do extrato final a analisar estar maioritariamente no estado líquido, o tipo de cromatografia é definida consoante o tipo de analito a estudar e da matriz extraída. Se os compostos não forem voláteis e apresentarem um elevado peso molecular é mais utilizada a cromatografia líquida. Na eventualidade dos compostos serem mais voláteis ou as amostras serem gases é utilizada a cromatografia gasosa.²¹ A denominação do tipo de cromatografia é estabelecida pela fase móvel.²¹ No entanto, o processo de análise é semelhante, uma vez que ambas requerem uma subida da pressão para que a fase móvel consiga penetrar na coluna onde contacta com a fase estacionária e consequentemente se processa a separação dos componentes da mistura. De um modo genérico, a fase móvel é responsável pelo transporte da amostra enquanto a fase estacionária é responsável pela separação dos analitos. Esta está normalmente contida numa coluna e é nesse enchimento que se dá a separação dos compostos, através das afinidades entre os compostos-alvo e essa fase.²¹ A separação dos picos resulta num gráfico definido pelo tempo de retenção e pela intensidade do sinal (cromatograma), e a identificação dos analitos é realizada através de padrões de referência, onde são conhecidos os tempos de retenção de cada composto. A quantificação dos mesmos é normalmente conseguida através de retas de calibração que podem ser criadas com padrões comerciais ou com material de referência certificado.

Portanto, a utilização da cromatografia permite não só a identificação do componente mas também a sua quantificação, ²¹ o que representa uma das grandes mais-valias associadas a esta técnica, além da grande sensibilidade que apresenta.

2.2.5.1 Cromatografia Gasosa

Os hidrocarbonetos são compostos voláteis, o que, como já foi referido, justifica a utilização da cromatografia gasosa para a sua determinação. Como tal, será a técnica analítica de quantificação utilizada neste trabalho, uma vez que, como será abordado posteriormente, é uma técnica de aplicação transversal a todo o tipo de hidrocarbonetos (Capítulo 3). A cromatografia gasosa, tal como todas as técnicas analíticas, apresenta vantagens e desvantagens na sua utilização. ²³ Algumas delas podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Vantagens e desvantagens da Cromatografia Gasosa

Vantagens	Desvantagens
Rapidez de análise	Limitado a amostras voláteis
Alta eficiência e resolução	Não é aconselhável para amostras instáveis termicamente
Alta sensibilidade (ppb ou ug/L)	Técnica difícil de executar para amostras sólidas grandes.
Alta precisão	Elevado custo do equipamento e manutenção
Pequeno volume de amostra	

Na Figura 4 ²⁴ é possível identificar os principais componentes de um cromatógrafo gasoso, que inclui todo o processo de decomposição, separação, deteção e identificação dos compostos presentes na mistura. Neste caso representa-se um sistema com deteção por ionização de chama (FID – *flame ionization detection*), uma vez que será este o utilizado na análise dos hidrocarbonetos em estudo nesta dissertação.

Tal como o nome da técnica indica, os gases são parte integrante deste sistema. Um dos três identificados na Figura 4 é utilizado para o transporte da amostra (denominado gás de arraste, geralmente o hélio), e os restantes são utilizados pelo detetor FID, para alimentarem a chama, nomeadamente o hidrogénio e o ar sintético. O processo inicia-se com a injeção do extrato no injetor. Após ser recolhida com recurso à seringa, a amostra é introduzida num tubo cilíndrico de quartzo que faz parte do injetor, denominado *liner*, que devido às altas temperaturas permite a volatilização da amostra.

Os analitos são então transportados para a coluna cromatográfica através do gás de arraste.

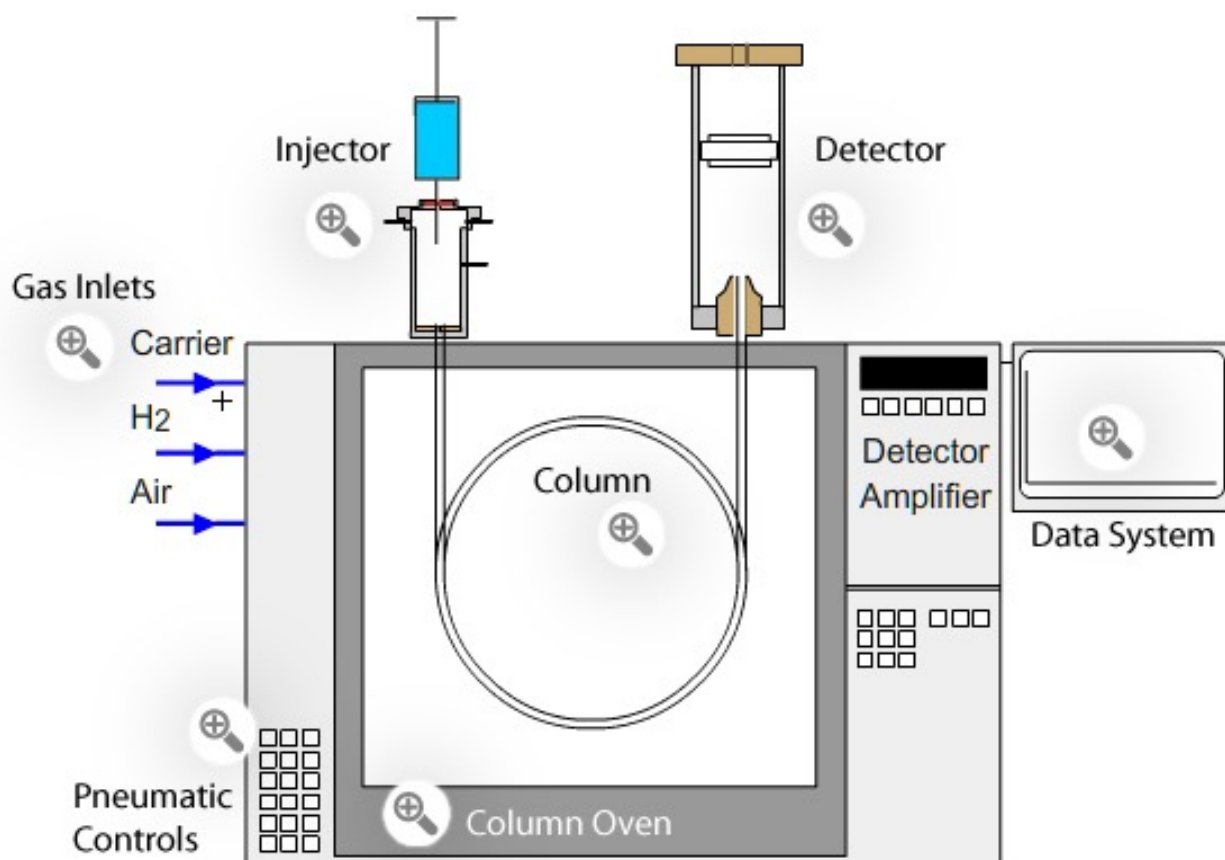


Figura 4 - Representação esquemática dos principais componentes de um cromatógrafo gasoso ²⁴

A coluna é o coração de todo o processo, ²³ e está inserida num forno que torna possível a criação de rampas de temperatura adequadas para o nosso tipo de análise. Os dois tipos de colunas utilizadas em GC são as compactadas e as capilares, ²³ com a característica mútua de poderem possuir a fase estacionária nos estado líquido ou sólido (Figura 5).

As primeiras colunas a serem utilizadas foram as compactadas, no entanto, cerca de 80% das análises realizadas hoje em dia utilizam as colunas capilares, ²³ devido à alta eficiência, maior rapidez e maior capacidade de separação de misturas complexas devido ao seu tamanho (até 100 m). ²¹

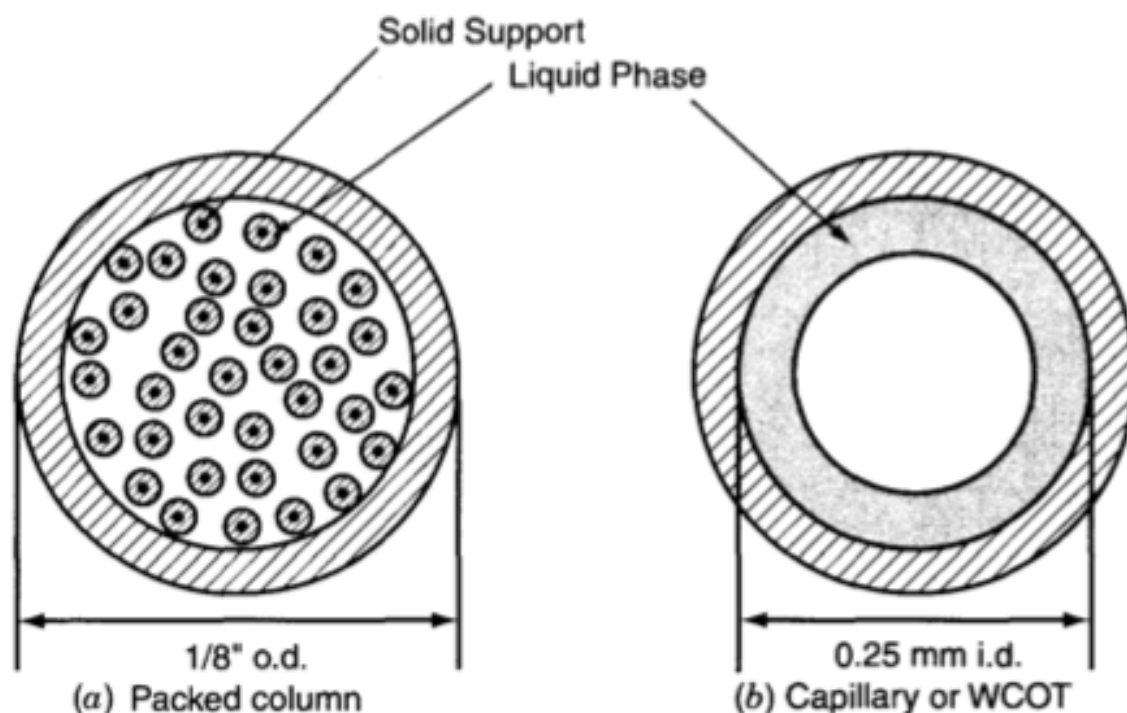


Figura 5 - Esquema de uma coluna compactada (esquerda) e de uma coluna capilar (direita) ²³

Depois da separação dos elementos na coluna, o detetor é usado para amplificar o sinal e detetar os componentes, e no total podem ser encontrados sessenta tipos de detetores diferentes, quase todos eles baseados na formação de iões. ²³ No entanto, os três mais utilizados são o FID, o ECD (*electron capture detector*) e o TCD (*thermal conductivity detector*). ²³ A especificação do detetor baseia-se, essencialmente, em dois fatores. Um deles é a sensibilidade, ou seja o sinal que este é capaz de produzir, e o outro é o ruído, que caracteriza a instabilidade do detetor. Quanto maior for o ruído menor será a sensibilidade.

Por fim, é necessário o tratamento de dados, e validação dos resultados, tal como em todas as técnicas analíticas. Os resultados são expressos através de picos de sinal elétrico, representados num cromatograma, definido pelo tempo de retenção (eixo dos xx) e pela área do pico (eixo dos yy). A partir daqui, a quantificação pode ser realizada com auxílio de retas de calibração e do programa informático disponibilizado pelo equipamento.

3 . Estado da arte

Atualmente o consumo do petróleo representa 32,9% da energia utilizada no mundo. Vem sendo referida a elevada dependência das sociedades por este tipo de energia e prova disso é o aumento de 1,9% (1,9 milhões de barris por dia),²⁵ do consumo em todo o mundo em 2015, que ultrapassa o aumento de 1,1% verificado em 2014 e bem acima da média verificada nos últimos anos, que se situa em 1%.²⁵

Tabela 6 - Valores referentes às reservas, produção e consumo de petróleo em 2015, por continente

	Reservas (Milhares Barris/dia)	Produção (Milhares Barris/dia)	Consumo (Milhares Barris/dia)
America do Norte	236	19 676	23 644
América do Sul e Central	329,2	7 712	7 083
Europa	155,2	17 463	18 380
Médio Oriente	803,5	30 098	9 570
Africa	129,1	8 375	3 888
Ásia	42,6	8 346	32 444
Total	1 679,6	91 670	95 008

A Tabela 6 permite compreender mais detalhadamente o consumo, a produção e as reservas existentes de petróleo. O Médio Oriente possui aproximadamente 50% das reservas mundiais do petróleo, todavia é na América do Sul e Central que se verifica a maior importância do petróleo na economia, comprovado pelo maior rácio entre as reservas e a produção. Na Europa tem-se verificado uma diminuição constante do consumo e das reservas de petróleo, que correspondem a 9% das reservas mundiais conhecidas e um terço delas situadas na Rússia. Relativamente a Portugal, desde 2005 até 2015, houve uma diminuição de 100 mil barris por dia,²⁵ devido ao aumento da aposta em energias limpas e renováveis em detrimento deste combustível fóssil.

O petróleo é uma fonte de energia não renovável, e com recurso à Tabela 6, constata-se que a procura é bastante mais alta que a oferta. Segundo um estudo da British Petroleum (BP)²⁵ as reservas só terão capacidade de suportar os consumos atuais por mais 51 anos, aproximadamente.

A contaminação do meio ambiente pela utilização de combustíveis fósseis, como o petróleo, é cada vez mais uma preocupação, pois começam a ser visíveis as primeiras consequências da má utilização dos recursos. Após uma pesquisa exaustiva, comprova-se que o TPH é um parâmetro acerca do qual a informação sobre estudos na literatura é muito escasso. Um exemplo é um trabalho ²⁶ referente a águas superficiais e subterrâneas situadas junto de um depósito de petróleo pertencente à corporação nacional de petróleo da Nigéria (NNPC, na terminologia inglesa *Nigeria National Petroleum Corporation*). Apesar de não serem o tipo de águas utilizadas nesta dissertação, é um estudo que nos revela em termos quantitativos, as contaminações de TPH. Estas podem ser verificadas na Tabela 7, ²⁶ onde se constata que a contaminação superficial é mais acentuada. Naturalmente, a distância à fonte de contaminação leva a que a concentração de TPH diminua nos dois tipos de águas estudadas.

Tabela 7 - Concentração de TPH nas águas superficiais e subterrâneas próximas de um depósito de petróleo na Nigéria.

Distância do local de amostragem até ao depósito	Água Superficial (mg/L)	Água Subterrânea (mg/L)
Depósito	27,4	13,3
20 m	-	2,7
100 m	-	3,2
160 m	20,3	-
6 Km	13,2	1,6

Em Portugal, como no resto do mundo, a contaminação por hidrocarbonetos acontece frequentemente, o que levou à celebração, em 2013, de um protocolo de colaboração entre a Associação Portuguesa de Empresas Petrolíferas (APETRO) e a Agência Portuguesa do Ambiente (APA), do qual resultou um relatório, que visa partilhar técnicas de preservação e mitigação sobre os solos e águas subterrâneas, que se intitula por “Benchmarking Legal e Metodológico para a Proteção de Solos e Águas Subterrâneas”. ²⁷ Em seguida houve a necessidade de um estudo mais profundo, de modo a criar um documento formal e que visa ser uma referência no setor, o “Guia Setorial para a Preservação e Remediação de Solos e Águas Subterrâneas pelo Setor Petrolífero”. ²⁸ Através deste guia é possível perceber que as contaminações de hidrocarbonetos em locais de atividade petrolífera podem ser consideráveis, ²⁸ como se verifica na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores referência para o índice TPH no setor de atividade petrolífera

Parâmetro	Solos	Águas Subterrâneas
TPH	15 515 mg/Kg	1,9 mg/L

De forma a perceber o risco que determinada concentração de poluentes tem para o meio ambiente e saúde pública, o guia setorial, ²⁸ idealiza uma Avaliação Quantitativa do Risco (AQR, ver Anexo II), que tem como principais objetivos perceber os potenciais riscos para a população e para os ecossistemas, definir quais os valores que poderão ter um risco aceitável e ainda apresentar eventuais medidas de mitigação. ²⁸

A avaliação do risco para ser completa e mais específica necessita de ensaios laboratoriais que são, regra geral, bastante dispendiosos, motivo pelo qual foram criados métodos capazes de obter informações importantes e significativas no terreno. Os métodos “Screening” envolvem equipamentos portáteis, que permitem a realização de medições de forma rápida, sistemática e não destrutiva, e são capazes de fornecer informação em tempo real, sobre os compostos orgânicos voláteis e sobre a zona contaminada. Após a recolha destes dados iniciais, as amostras seguem para análise laboratorial de forma selecionada, e direccionada à análise mais adequada, abrindo caminho a uma diminuição dos custos e uma maior objetividade. ²⁸

As análises laboratoriais são requeridas consoante o poluente presente no meio ambiente e as necessidades legislativas a cumprir. Em relação aos hidrocarbonetos a escolha do tipo de análise é complicada, devido às limitações que apresentam, nomeadamente a falta de especificidade e curtas janelas de temperatura de ebulição, ⁹ contudo a cromatografia gasosa é utilizada pela maioria dos métodos. ⁹ Os métodos para a análise dos diferentes hidrocarbonetos, apresentados na Tabela 9, seguem em geral normas oficiais e são adequados para cada tipo de composto ou classe de compostos.

Tabela 9 - Técnicas laboratoriais e métodos normativos associados à análise dos hidrocarbonetos

Parâmetro	Técnica Laboratorial	Método	Razão da Análise
TPH (C10 - C40)	GC - MS GC - FID	EPA 8260 B ISO 9377-2	Caráter geral
Alifáticos	GC - MS; HeadSpace GC - FID	-	Análise por cadeias para a definição de uma AQR
Aromáticos	GC - MS; HeadSpace GC - FID	-	Análise por cadeias para a definição de uma AQR
BTEX	Purge and Trap GC - MS	EPA 8260 B	Hidrocarbonetos leves
Polícíclicos	GC - MS	EPA 8270 EPA 8131 EPA 8091 EN ISO 6468	Hidrocarbonetos pesados

Como é possível comprovar pelos métodos apresentados na Tabela 9, ²⁸ a cromatografia é uma técnica comum a todas as determinações, o que revela a sua importância na análise destes compostos químicos. Atualmente a versatilidade da cromatografia é grande, e de forma a comprovar isso os laboratórios Biogerm, S.A., onde decorreu o trabalho experimental desta dissertação, possuem cinco equipamentos de cromatografia, utilizados na análise alimentos, de águas de consumo humano e águas residuais. Como já foi descrito na secção 2.1.5., a cromatografia gasosa não é a única técnica utilizada para a determinação de hidrocarbonetos. Por exemplo, a gravimetria, a fluorescência UV ou a QCL-IR (*Quantum Cascade Laser Infrared*) ²⁹ são métodos que também foram utilizados para a determinação deste tipo de compostos. Na Tabela 10 estão referidas algumas técnicas utilizadas para as diferentes matrizes.

Tabela 10 - Métodos de determinação de hidrocarbonetos e limites de deteção

Tipo de Análise	Matriz	Análise	Limite de Deteção	Recuperação %
Gravimetria ⁹	Águas Águas Residuais	Óleos	5 mg/L	93
	Lamas	Óleos	10 mg/L	93
Espetrometro de Infração ⁹	Águas	Óleos	0,2 mg/L	99
GC-FID ⁹ GC-MS	Ar	Hidrocarbonetos (36-126°C)	0,001 a 0,01 mg/ amostra	>75
	Tecido de Peixe	TPH	0,1 mg/L	-

Em Portugal as análises laboratoriais de TPH com recurso à cromatografia gasosa são escassas, pois apenas dois laboratórios estão devidamente acreditados para a realização das análises por GC-FID, pelo Instituto Português da Acreditação (IPAC). A determinação de hidrocarbonetos totais está largamente implementada pela técnica de *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR). Em Portugal, um total de 13 laboratórios em Portugal Continental estão certificados para a realização de tais análises.

Na informação disponível no IPAC ³⁰ é possível constatar no que concerne aos hidrocarbonetos uma maior preocupação pelos PAHs, uma vez que inúmeros laboratórios realizam apenas a análise a estes compostos, que como já foi referido anteriormente, apresentam um risco potencialmente mais elevado para a saúde pública. Apesar da determinação de TPH por cromatografia gasosa ser uma técnica pouco utilizada em Portugal, a Biogerm, como uma empresa de referência no setor da água e com grande reconhecimento no mercado atual, entende que esta técnica é uma mais-valia atual e futura. Para ajudar a perceber os principais problemas associados a esta técnica de análise e à sua implementação, foi efetuada uma formação. Esta formação permitiu não só um maior conhecimento dos compostos a analisar bem como uma maior perceção da técnica de análise. A principal particularidade deste método analítico prende-se com a integração dos picos. Em cromatografia os diversos componentes a analisar são normalmente divididos e tratados de forma individual, mas ao invés o TPH é integrado pelo somatório das áreas presentes entre os compostos C₁₀ e C₄₀. O manuseamento e preparação das amostras não é problemático, excetuando as águas com uma carga orgânica muito elevada que por vezes criam dificuldades, nomeadamente emulsões. Importa ainda referir que a retenção de hidrocarbonetos na coluna capilar pode criar dificuldades na obtenção de brancos com níveis aceitáveis para prosseguir a análise.

4. Método Analítico

Na química analítica a preparação das amostras a par do bom estado do equipamento laboratorial serão os passos mais preponderantes para uma correta e eficaz análise. De forma a perceber os principais problemas associados a esta técnica de análise e à sua implementação, foi efetuada uma formação. Esta formação permitiu não só um maior conhecimento dos compostos a analisar bem como uma maior perceção da técnica de análise. A principal particularidade deste método analítico prende-se com a integração dos picos. Em cromatografia os diversos componentes a analisar são normalmente divididos e tratados de forma individual, ao invés do TPH que é integrado pelo somatório das áreas presentes entre os compostos C₁₀ e C₄₀. Importa ainda referir que a retenção de hidrocarbonetos na coluna capilar pode criar dificuldades na obtenção de brancos com níveis aceitáveis para prosseguir a análise. No entanto, as condições ideais de trabalho muito dificilmente serão obtidas apenas na literatura/formação, uma vez que a implementação pode diferir em cada caso.

Nesta dissertação, o método analítico usado teve por base o protocolo utilizado pela Biogerm, e que está presente num repositório de métodos cromatográficos,³¹ designado por “*Hydrocarbon Oil Index Determination in Water Using a Simple, Cost-Effective System*”.³² Em seguida descrevem-se os principais passos da metodologia posta em prática para a análise de hidrocarbonetos (TPH) em águas residuais.

4.1. Material e Equipamento

A análise de hidrocarbonetos por cromatografia gasosa requer uma preparação prévia da amostra, onde são utilizados os materiais apresentados na Tabela 11, juntamente com os equipamentos necessários para a leitura e análise dos resultados.

Tabela 11 - Material e equipamento utilizado na análise de TPH nos laboratórios da Biogerm

Material	
Material de Vidro	Balões Volumétricos Frasco de 1000 ml de preferência âmbar. Pipetas Volumétricas Ampola de decantação Tubos de vidro (50 ml) Tubos de vidro graduado (10ml)
Material de laboratório	Magnetos Agitador Magnético Balança Digital Pipetas de Pasteur Linha de Azoto Vials (1,5ml)
Equipamento	Computador Cromatógrafo Gasoso Shimadzu GC - 2010 Plus FID (Flame Ionization Detector)
Programa informático	Shimadzu LabSolutions LITE

Tal como já foi referido anteriormente a análise de TPH realiza-se através de um equipamento de cromatografia gasosa. Neste caso da marca Shimadzu (GC-2010 Plus), modelo apresentado na Figura 6.

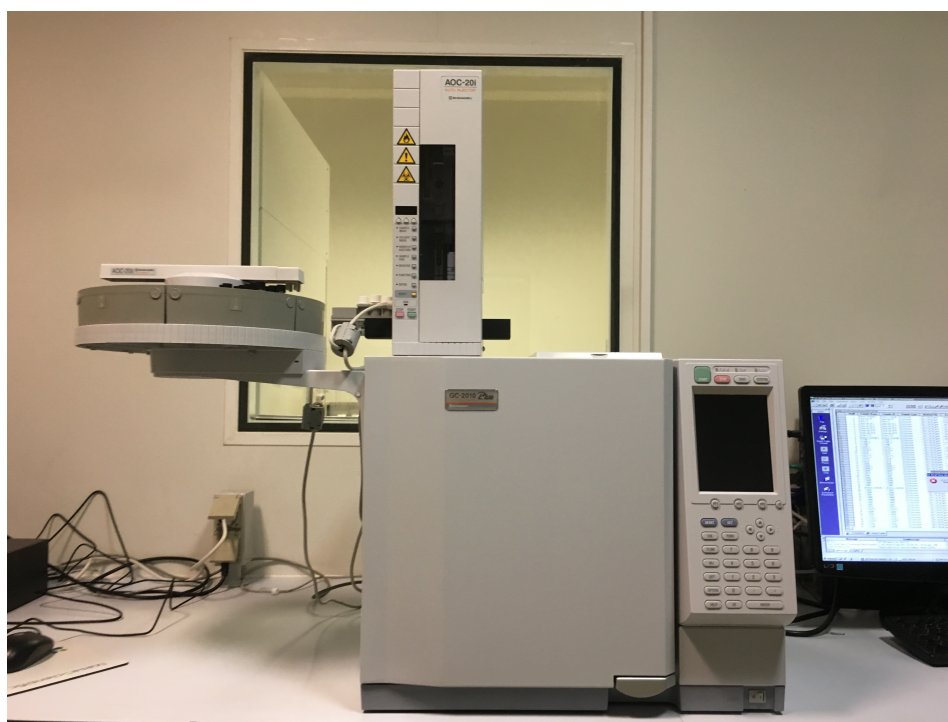


Figura 6 - Cromatógrafo gasoso - Shimadzu GC2010 plus

A utilização correta deste equipamento exige a elaboração de um modelo cromatográfico, que consiste na definição de parâmetros para cada um dos componentes do processo, tal como se descreve mais adiante nesta dissertação.

4.2. Protocolo Laboratorial

Para que a análise dos compostos-alvo decorra com sucesso, há que seguir determinados passos que compõem o protocolo laboratorial. No caso em estudo, as principais etapas são as seguintes:

● Recolha e preservação da amostra

A recolha da amostra deve ser efetuada para um frasco de 1000 ml, de preferência em vidro âmbar e conservadas entre 2 a 8 °C. A preservação da amostra requer a sua acidificação ($\text{pH} < 2$) com ácido sulfúrico (H_2SO_4 (1+1)) e devem ser extraídas nos 4 dias seguintes à colheita. ¹

● Preparação da reta de calibração

Neste método de análise a reta de calibração é definida diariamente, o que significa que por cada conjunto de amostras a analisar tem de ser feita uma nova reta de calibração. Uma mistura comercial de óleos minerais, com referência à norma ISO-9377, ¹ é a solução base para a realização dos padrões (Tabela 12), de onde se obtém a solução do padrão 5, através da pesagem de 100 mg para 100 ml de solvente de extração (n-pentano). ¹ Os restantes padrões são diluições efetuadas através da solução anteriormente descrita. ¹

Tabela 12 - Padrões da reta de calibração para a análise do TPH

Padrão	Concentração (mg/L)	Diluição
Padrão 1 (Anexo III)	200	5:25
Padrão 2	400	10:25
Padrão 3	600	15:25
Padrão 4	800	20:25
Padrão 5 (Anexo IV)	1000	Direto

● Preparação de amostras ¹

- Pesar a massa do recipiente onde a amostra foi colhida;
- Adicionar 50 ml de solvente de extração (n-pentano) a 900 ml de amostra;
- Agitar a amostra, no mínimo 30 minutos, com recurso a um agitador magnético;
- Colocar a amostra numa ampola de decantação e esperar a devida separação;
- Pesar o recipiente vazio onde a amostra foi colhida;
- Retirar o sobrenadante para um tubo de vidro de 50 ml, filtrando-o através de uma camada de Florisil (sorbente à base de sílica);
- Utilizar um concentrador de azoto para reduzir o volume de 50 ml para 5 ml, aproximadamente, e transferi-lo para um tubo de vidro graduado de 10 ml;
- Utilizar novamente o concentrador de azoto e reduzir a amostra até 1 ml, aproximadamente;
- Passar a amostra para os *vials*;
- Colocar os *vials* no amostrador automático e proceder à análise cromatográfica;

Nota: Se forem verificadas emulsões nas amostras, adiciona-se 80 g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), antes da agitação, para as reduzir, minimizando assim possíveis interferências na análise.

● Análise Cromatográfica

As amostras são colocadas num amostrador automático de 120 posições. A volatilização da amostra acontece após a sua injeção, num compartimento presente no injetor denominado *liner*, que é um tubo de quartzo que se encontra a uma temperatura de 340°C (ver Tabela 13). De forma a preservar a coluna de resíduos, os *liners* possuem lã de vidro para que a corrente gasosa injetada na coluna seja filtrada e atinja uma miscibilidade superior, o que obriga a uma troca periódica da responsabilidade do técnico laboratorial.

Tabela 13 - Parâmetros do injetor do cromatógrafo gasoso

Parâmetro		Condições de análise	Condições de referência ³²
Injetor	Volume de Injeção	1,0 uL	1,0 uL
	Modo de Injeção	<i>Split</i> (Dividido)	<i>Split</i> (Dividido)
	Temperatura	340 °C	350 °C
	Tempo de Amostragem	0,80 min	

No *liner* acontece também a pressurização, ou seja, o gás de arraste é introduzido a uma pressão considerável, para que a amostra seja capaz de ultrapassar o filtro (lã de vidro) e entre na coluna cromatográfica. O gás de arraste tem de ser inerte e neste caso utiliza-se o hélio, com uma pureza de 99,9%. A escolha recai, geralmente, neste gás devido à alta eficiência verificada em fluxos mais elevados de gás. ³³ As condições relativas ao hélio estão descritas na Tabela 14.

Tabela 14 - Condições de operação do gás de arraste

Parâmetro		Condições de análise	Condições de referência ³²
Gás de Arraste Hélio (He)	Pressão	1,0 bar	
	Fluxo Total	80 mL/min	80 mL/min
	Fluxo na Coluna	1,33 mL/min	
	Velocidade Linear	30,8 cm/seg	
	Fluxo de Purga	3,0 mL/min	
	Rácio de divisão	56,9	20

A coluna de análise cromatográfica é um fator chave para a realização da análise e a sua escolha é por vezes complexa. Neste caso é utilizada uma coluna, da marca Thermo Scientific, TG - 5SILMS. As condições de operação encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15 - Condições de operação da coluna cromatográfica

Parâmetro		Condições de análise	Condições de referência ³²
Coluna	Temperatura Inicial	40 °C	40°C
	Tempo	1 min	0,5 min
	Taxa de Aumento	25 °C/min	50 °C/min
	Temperatura Final	340 °C	350 °C
	Tempo	20 min	1,30 min
	Comprimento	30 m	15 m
	Diâmetro Interno	0,25 mm	0,25 mm
	Espessura interior	0,25 µm	0,25 µm

O programa de temperaturas do forno descrito de forma numérica na Tabela 15, é apresentado graficamente na Figura 7. Inicia-se aos 40°C e estende-se aproximadamente por doze minutos até atingir a temperatura máxima definida, mais concretamente, os 340°C. Durante este período de tempo os hidrocarbonetos são separados conforme referido anteriormente, por afinidade com a fase estacionária.

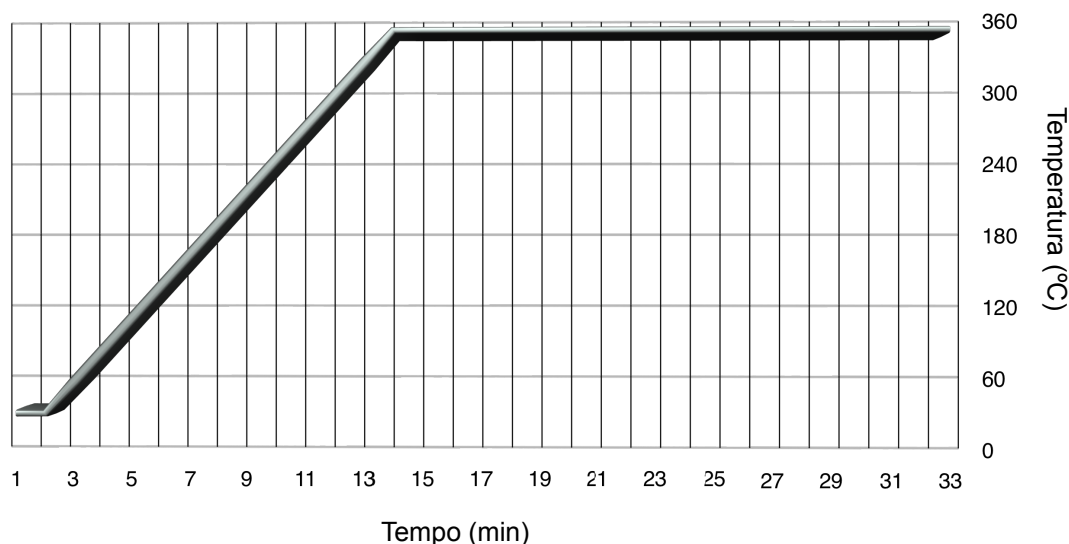


Figura 7 - Programa de temperatura da coluna cromatográfica

O último componente do cromatógrafo gasoso é o detetor, neste caso, de ionização por chama (FID). O modo de funcionamento deste tipo de detetor prende-se com a junção do hidrogénio e do ar, com o gás proveniente da coluna, na chama onde através da combustão são libertados os iões que posteriormente são amplificados e registados, como picos, à saída do detetor.³⁴

De forma a comprovar a sua versatilidade este detetor é também utilizado na análise cromatográfica de alimentos realizada no laboratório da Biogerm. É importante referenciar o pequeno aumento da temperatura verificado entre a coluna e o detetor, que existe para evitar a deposição de resíduos no detetor. As condições de operação constam na Tabela 16.

Tabela 16 - Condições de operação do detetor

Detetor	Parâmetro	Condições de análise	Condições de referência ³²
FID	Temperatura	350 °C	350 °C
	Tempo de Leitura	33 min	8 min
	Fluxo de Ar Sintético	400 mL/min	-
	Fluxo de Hidrogénio	40 mL/min	-

● Limpeza do material

A limpeza do material no final de cada análise não está protocolarmente estipulada, mas é de extrema importância, motivo pelo qual serão adotadas as medidas de limpeza utilizadas nos laboratórios da Biogerm para o material utilizado no processamento de águas residuais. Atendendo que as águas residuais apresentam uma maior quantidade de carga orgânica e matéria em suspensão este processo torna-se mais complexo e também mais preponderante quando comparado com a limpeza do material utilizado para águas de consumo humano. Tal obriga a cuidados adicionais, tais como a passagem do material varias vezes por água e uma preliminar lavagem com acetona, como pode ser verificado nos pontos seguintes.

- Lavagem do material com água da rede pública;
- Lavagem do material com Acetona (99% Pureza);
- Enxaguar o material com água da rede pública;
- Mergulhar o material em HNO₃ (Ácido Nítrico);
 - 20 % HNO₃
 - 12 Horas
- Enxaguar o material com água desionizada;
- Secar na estufa (55 °C - 58 °C);

Recorrendo à experiência na atividade diária do laboratório é possível afirmar que este é um método eficaz. No entanto, se os resíduos ficarem encrostados no material é obrigatório fazer uma lavagem na máquina de lavar, para garantir que estes não se depositem no ácido. A deterioração e contaminação do ácido vai ocorrendo de forma natural à medida que o material sujo é mergulhado, razão pela qual existe uma periodicidade quinzenal para a renovação das soluções de limpeza.

4.3. Parâmetros de Validação

A validação de um método analítico requer, obrigatoriamente, um documento que permita a realização da análise, por alguém devidamente qualificado, e é designado por instruções de trabalho (IT) (Anexo V), no qual são descritas as diversas tarefas a serem desenvolvidas ³⁵ (Ver Tabela 17).

Tabela 17 - Características das instruções de trabalho

Instruções de Trabalho	
Princípios Teóricos	Introdução à análise Explicação dos contaminantes Principais preocupações
Campo de Aplicação	Compostos a analisar Gama de trabalho Interferências Restrições
Material/Reagentes	Equipamentos Padrões da reta e controlo Reagentes Material laboratorial
Calibração	Padrões de referência Curva de calibração
Ensaio	Condições de ensaio Preparação da amostra Condições ambientais Critérios de aceitação Controlo (referência e independentes)
Resultados	Fórmulas de cálculo Tratamento de dados Apresentação de resultados Controlo de qualidade

Durante a realização das auditorias as IT são um documento bastante requisitado e minuciosamente analisado de forma a garantir que tudo é realizado conforme o descrito no documento. As características apresentadas na Tabela 17 são consideradas imprescindíveis, contudo e dependendo das análises a realizar poderão ser inúmeras as referências a acrescentar a esta lista, todas aquelas que a direção do laboratório achar conveniente para uma correta e segura elaboração do plano. Alguns destes parâmetros cruciais que serão tratados neste trabalho são descritos em seguida.

4.3.1 Calibração

A quantificação dos compostos a analisar tem por base a reta de calibração, efetuada no início da análise, que relaciona a resposta do sistema com concentrações conhecidas, denominadas por soluções-padrão. Para que seja criada uma gama de trabalho correta, deve-se ter em consideração diversos fatores, tais como o tipo de equipamento, as matrizes das amostras a analisar e o cumprimento dos valores estabelecidos por lei, entre outros. O estudo da calibração é efetuado através do teste de homogeneidade de variâncias e do teste PG, que consistem na determinação das variâncias do primeiro e último padrão e na comparação com valores tabelados, respetivamente. Isto permite definir a gama de trabalho e o tipo de equação (1ª ou 2ª ordem) associada à calibração. ³⁵ A escolha por curvas de calibração quadráticas, requerem uma justificação válida, caso contrário aconselha-se uma diminuição da gama de trabalho para a obtenção de uma calibração linear (expressa genericamente pela expressão $y = ax + b$, em que **a** é o declive e **b** é a ordenada na origem).

A existência de uma referência bibliográfica reconhecida, como são o caso das normas ISO e dos *Standard Methods*, permite aligeirar os estudos dos limites da gama de trabalho, uma vez que esta já se encontra devidamente definida e ajustada. A norma ISO 9377 ¹ é a referência utilizada nesta implementação de método, onde a gama de concentrações está definida de acordo com a Tabela 12.

As gamas de trabalho, tal como referido anteriormente, são dependentes da matriz a analisar, o que pode resultar na necessidade de 2 gamas de trabalho para o mesmo método, de forma a contemplar todas as amostras, e a determinação de hidrocarbonetos é um desses exemplos. As águas residuais de petrolíferas tendem a apresentar concentrações de hidrocarbonetos elevadas ao invés das águas superficiais que possuem hidrocarbonetos mas em concentrações nunca comparáveis com as águas residuais. Isto obriga a uma diminuição, (de cerca de 90%) do valor de todos os padrões da reta. A diferenciação acontece essencialmente, pelas interferências que se podem verificar na gama baixa, e pelos valores legais que não são respeitados na gama alta.

O padrão mais baixo da reta pode funcionar como o limite de quantificação (LQ), contudo nem sempre se verifica esta condição. O valor do LQ deve ser devidamente calculado para que não sejam emitidos erros para o cliente. Na preparação das amostras para realizar esta análise a amostra será concentrada até 1 ml, razão pela qual o LQ emitido para o cliente será 0,2 mg/L.

4.3.2 Precisão

A precisão associada a um método analítico é avaliada através da repetibilidade e da reprodutibilidade deste, que tem como principal objetivo identificar a dispersão dos resultados.³⁵

A repetibilidade consiste na realização de vários ensaios sobre a mesma amostra ($n > 9$), mantendo as condições o mais estáveis possível, nomeadamente o analista, o equipamento, o laboratório e os reagentes. Os cálculos necessários iniciam-se pela estimativa da variação (Equação 2, S_{ri}^2), com recurso à variância dos resultados obtidos (S_{wi}^2) e aos graus de liberdade da série de análises ($n_{wi}-1$)

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi} - 1) \times S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi} - 1)} \quad \text{Equação 2 - Estimativa de variação}$$

De seguida obtém-se o limite de repetibilidade (Equação 3, r), com um nível de confiança de 95% ($t = 1,96$),³⁵ através da estimativa de variâncias.

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_{ri} = 1,96 \times \sqrt{2} \times S_{ri} \quad \text{Equação 3 - Limite de repetibilidade}$$

O coeficiente de variação da repetibilidade é dado pela razão entre o desvio padrão da repetibilidade e da média dos valores considerados. (Equação 4)

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 4 - Coeficiente de variação de repetibilidade}$$

A reprodutibilidade de um método analítico é uma repetição da amostra em condições de ensaio diferentes, ou seja, há a modificação do que foi mantido aquando da repetibilidade.³⁵ Esta avaliação é realizada em ensaios interlaboratoriais, que são amostras com um valor estabelecido, que permitem perceber as variações de resultados e também avaliar o desempenho dos laboratórios participativos.³⁵

Outra medida representativa da variabilidade dos resultados é a precisão intermédia, onde se efetuam no mínimo dez medições em replicado, duplicado ou ensaio

único ³⁵ dos padrões mais baixo, intermédio e mais alto da reta de calibração. Calcula-se com base no coeficiente de variação de repetibilidade e na estimativa de variação, permitindo uma definição preliminar do arredondamento utilizado no resultado final.

4.3.3 Exatidão

Tabela 18 - Processos de avaliação da exatidão de um método analítico

Avaliação dos Resultados		Fórmula de Cálculo
Materiais Referência Certificados	Erro relativo	$Er = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} \times 100$
	Teste de hipótese	$t = \frac{(X_{lab} - X_v) \times \sqrt{N}}{Sx_{lab}}$
	Fator de desempenho (Z-score)	$Z = \frac{X_{lab} - X_v}{S}$
	Erro normalizado	$En = \frac{X_{lab} - X_v}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$
Ensaio Interlaboratoriais	Avaliação do desempenho	*
	Erro normalizado	**
Testes Comparativos	Erros do tipo I e tipo II	-
	Teste t das médias	-
	Teste t das diferenças	-
	Teste de regressão linear entre dois métodos de ensaio	-
Ensaio de Recuperação	% de recuperação obtida	$\% Rec = \left(\frac{X_{lab} - \frac{V_a \times C_a}{V_t}}{\frac{C_p \times V_p}{V_t}} \right) \times 100$

* - Cálculo igual ao fator de desempenho (Z-Score)

** - Cálculo igual ao erro normalizado anterior

X_{lab} - Valor obtido experimentalmente; X_v - Valor certificado; N - Número de Amostras; S_{xlab} - Desvio Padrão associado à média dos valores obtidos experimentalmente; S - Incerteza do Material de Referência Certificado; U_{lab} - Incerteza do resultado obtido no laboratório; U_{ref} - Incerteza associada ao valor verdadeiro; V_a - Volume da amostra; C_a - Concentração da amostra; V_p - Volume do padrão adicionado; C_p - Concentração do padrão; V_t - Volume total;

A exatidão é também ela uma avaliação necessária para a validação do método e permite perceber a resposta do sistema com valores teoricamente conhecidos. Existem quatro processos normalmente utilizados para esta análise, nomeadamente, a utilização de ensaios interlaboratoriais, de materiais de referência, de testes comparativos ³⁵ e ainda ensaios de recuperação. A recuperação é um processo onde se dopa uma amostra, com uma concentração conhecida do analito e de seguida desenvolve-se a todo o processo de análise, verificando-se a percentagem de analito obtido após a leitura cromatográfica. As várias formas de tratamento de dados associados a cada tipo de processos estão descritos na Tabela 18.

4.3.4. Incerteza

A incerteza associada ao resultado final é o parâmetro que permite caracterizar a dispersão de valores, ³⁶ que normalmente vai sendo aumentada à medida que se realizam os procedimentos necessários ao tratamento da amostra. ³⁷ Este valor pode ser calculado de diferentes maneiras. Por exemplo, através do somatório de todas as incertezas inerentes (U) (Equação 5) a cada fase do processo ou através dos ensaios de recuperação e dos resultados da precisão evidenciada pelo método.

$$U_c = \sqrt{\sum U_i^2}$$

Equação 5 - Incerteza combinada (Somatório das incertezas inerentes a todo o processo) ³⁸

U_c - Incerteza Combinada; U_i - Incerteza associada a todos os processos do método

O cálculo das incertezas associadas ao TPH foi baseado nos ensaios de precisão e nos estudos de recuperação (Equação 6), através dos seguintes cálculos.

S - Desvio padrão dos duplicados; n - Número de duplicados; $C_{Amostra}$ - Concentração obtida na amostra; X_r - Média dos resultados obtidos nas recuperações; $S_{\%Recuperação}$ - Desvio padrão da percentagem de recuperação obtida

$$U_{Precisão} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad U_{Recuperação} = \frac{C_{Amostra} \times (S \%REC/X_r)}{\sqrt{n}}$$

Equação 6 - Incerteza associada à precisão e incerteza associada às recuperações ³⁹

A incerteza combinada (U_c) é dada pelo somatório das duas incertezas anteriormente apresentadas. (Equação 7)

$$U_c = U_{Precisão} + U_{Recuperação} \quad \text{Equação 7 - Incerteza combinada}$$

De modo a garantir um nível de confiança de 95,5%, procede-se ao cálculo da incerteza expandida. (Equação 8) ³⁸

$$U_{Expandida} = 2 \times U_c \quad \text{Equação 8 - Incerteza expandida para um nível de confiança de 95\%}$$

A incerteza relativa, que é o dado final que se pretende encontrar é obtido pela afetação da incerteza expandida calculada anteriormente relativamente à concentração da amostra. (Equação 9)

$$\% U_{relativa} = (U_c \times 100) \times C_{Amostra} \quad \text{Equação 9 - Incerteza relativa do método de ensaio}$$

Atualmente, as incertezas calculadas nos laboratórios da Biogerm são largamente baseadas nos ensaios interlaboratoriais. Como não foi possível a participação neste tipo de ensaios neste procedimento analítico em particular, as incertezas foram calculadas com base no controlo de qualidade, através de duplicados de amostras reais e também

de recuperações. Esta metodologia é baseada num guia criado pelo IPAC, ³⁹ com especial foco no cálculo de incertezas associadas a métodos analíticos. Existe também uma norma, criada pela ISO, que permite o cálculo das incertezas associadas aos métodos analíticos. (Norma ISO - 11352). ⁴⁰

4.3.5. Teste em Amostras Reais

A validação de um método não fica completa sem testar a sua exequibilidade na análise de amostras reais, que na maior parte dos casos se revelam mais complexas de analisar. No decurso do trabalho várias amostras reais serão analisadas, pelo que uma correta quantificação do TPH nestas verificará o sucesso deste parâmetro também.

5. Resultados e Discussão

Até agora foram abordados todos os processos necessários à implementação do método, desde a definição do analito, a apresentação da técnica, a preparação da amostra e ainda o método de análise, pelo que uma apresentação e análise crítica dos resultados obtidos é o passo seguinte. Nesta secção irão ser abordados os procedimentos de otimização e validação associados a esta técnica, incluindo resultados obtidos em amostras reais (naturalmente contaminadas). Como foi referido anteriormente, o resultado da concentração de hidrocarbonetos é emitido considerando um único parâmetro, o total de hidrocarbonetos do petróleo encontrados entre o C10 (n-decano) e o C40 (n-tetracontano), expresso em mg/L (TPH).

No que diz respeito à gama de trabalho, é importante referir que os limites definidos na reta de calibração não são os limites emitidos para o cliente, atendendo a que durante o processo se dá a concentração da amostra a 1 mL. Assim, os valores do limite de quantificação (LQ) e do padrão 5 (o mais concentrado da reta) passam a ser de 0,2 mg/L e de 1 mg/L, respetivamente (ver Tabela 12).

Por sua vez, a janela de trabalho cromatográfica foi definida através da sobreposição dos cinco padrões da reta, onde se definiu um tempo de retenção de 4,675 minutos e 12,292 minutos, para o C10 e o C40, respetivamente. A identificação dos picos neste intervalo é definida pelos parâmetros de integração existentes no sistema de análise cromatográfica (LabSolutions) e podem ser consultados na Tabela 19. Para além desta integração automática, é obrigatória a análise do cromatograma por parte do técnico de laboratório, de modo a validar os resultados obtidos e a identificar possíveis picos com menor definição e próximos da área mínima definida, passíveis de serem contabilizados.

Tabela 19 - Parâmetros de integração definidos no sistema LabSolutions

Parâmetro	Valor	Unidades
Largura	3	Segundos
Declive	1000	uV/min
Derivada	n.a.	uV/min
Área Mínima	100	

A validação dos resultados obtidos inicia-se na criação da reta de calibração, que é aceite com um coeficiente de correlação superior ao habitualmente definido em cromatografia ($r > 0,995$). O fator de correlação permite assegurar uma boa linearidade dos padrões e a diminuição do erro associado ao resultado final. O processo de análise dos hidrocarbonetos não termina na identificação dos picos e da área total de integração. Apesar de o sistema informático fornecer uma concentração baseada na reta de calibração, as massas registadas durante a preparação e a concentração da amostra, obriga a um cálculo, descrito na Figura 8, ¹ que indica o índice de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH), em mg/L, e neste caso aplicado à análise de águas residuais.

$$\rho = \frac{(Am - b) * f * V * \omega}{a(m1 - m2)}$$

Figura 8 - Fórmula de cálculo para a determinação do índice de hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH)

Am - Área de picos integrada no cromatograma

b - Ordenada na origem

f - Factor de diluição

V - Volume final do extrato, ml

w - Densidade da amostra, g/ml

a - Declive da reta de calibração, l/mg

m1 - Massa do recipiente com amostra, g

m2 - Massa do recipiente sem amostra, g

De seguida serão apresentados e discutidos resultados dos vários testes realizados para a implementação do método de análise, mais concretamente, a sua otimização e procedimentos de validação.

5.1. Otimização do Método

A otimização de um método analítico é uma necessidade para atingir as condições ideais de trabalho, sendo o técnico de laboratório o responsável por estas melhorias que vão acontecendo à medida que vão surgindo os desafios colocados pela análise. Como referido na secção 4.2., existem referências bibliográficas para o protocolo cromatográfico, mas a sua implementação no laboratório pode requerer alguns ajustes, por exemplo devido às diferenças de equipamento disponível.

Neste trabalho, os ajustes foram acontecendo de forma natural e à medida que apareciam as dificuldades. O tempo de análise foi revisto e modificado para que não houvesse interferências nas análises posteriores. Como se pode observar pelo cromatograma da Figura 9, existem vários picos posteriores ao tempo de retenção definido para o C₄₀ (12,292 segundos), que podiam ser explicados pela presença de hidrocarbonetos com um ponto de ebulição acima dos 548 °C (ponto de ebulição do C₄₀).¹ No entanto, também se verificou que a concentração de hidrocarbonetos no branco (Anexo VI) aumentou bastante, o que permitiu concluir que havia a retenção do analito na coluna, o que provocava interferências na análise posterior.

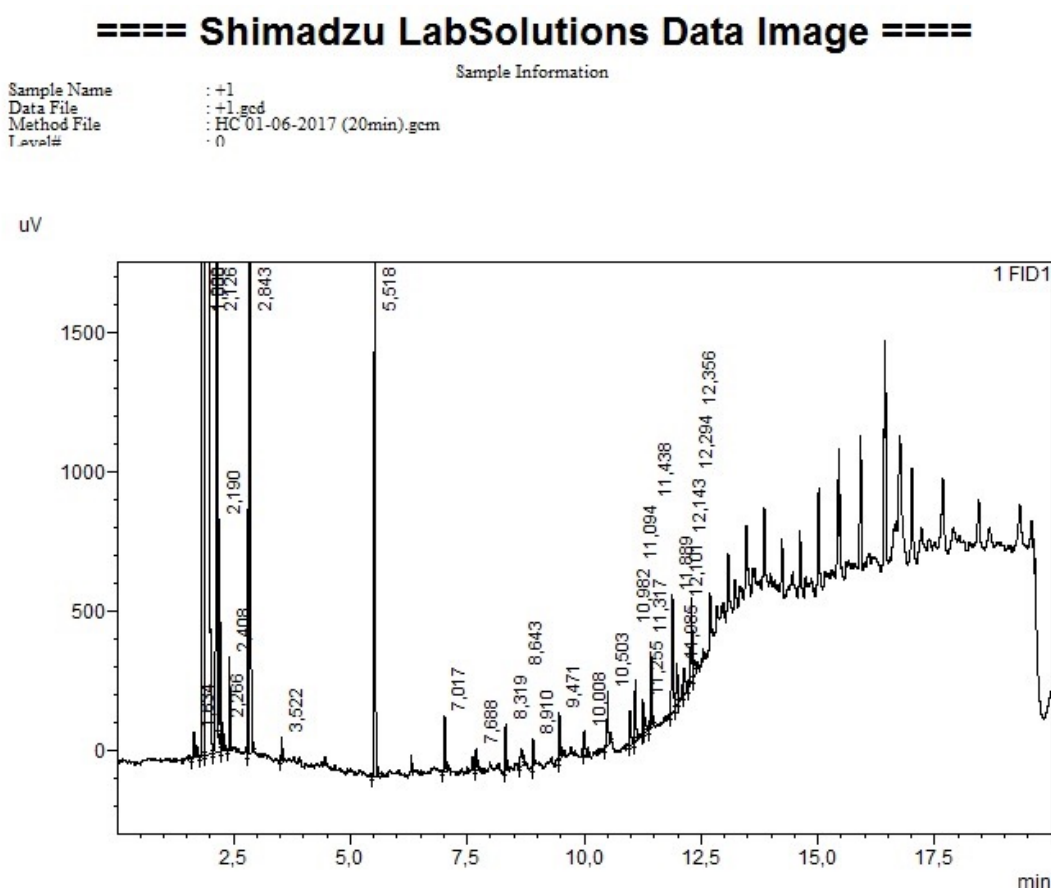


Figura 9 - Cromatograma com a interferência dos picos retidos

Para a resolução deste problema, inicialmente, procedeu-se à limpeza da coluna através da injeção de dez amostras de solvente de extração. Este procedimento não resolveu o problema, pelo que se tentou o aumento do tempo da análise de 20 para 33 minutos. Neste período de tempo, a coluna encontra-se no mais alto valor de temperatura, passando dos 6,6 minutos para os 20 minutos para que houvesse a eliminação de todos os hidrocarbonetos, obtendo-se resultados satisfatórios, como se pode verificar pelo cromatograma da Figura 10.

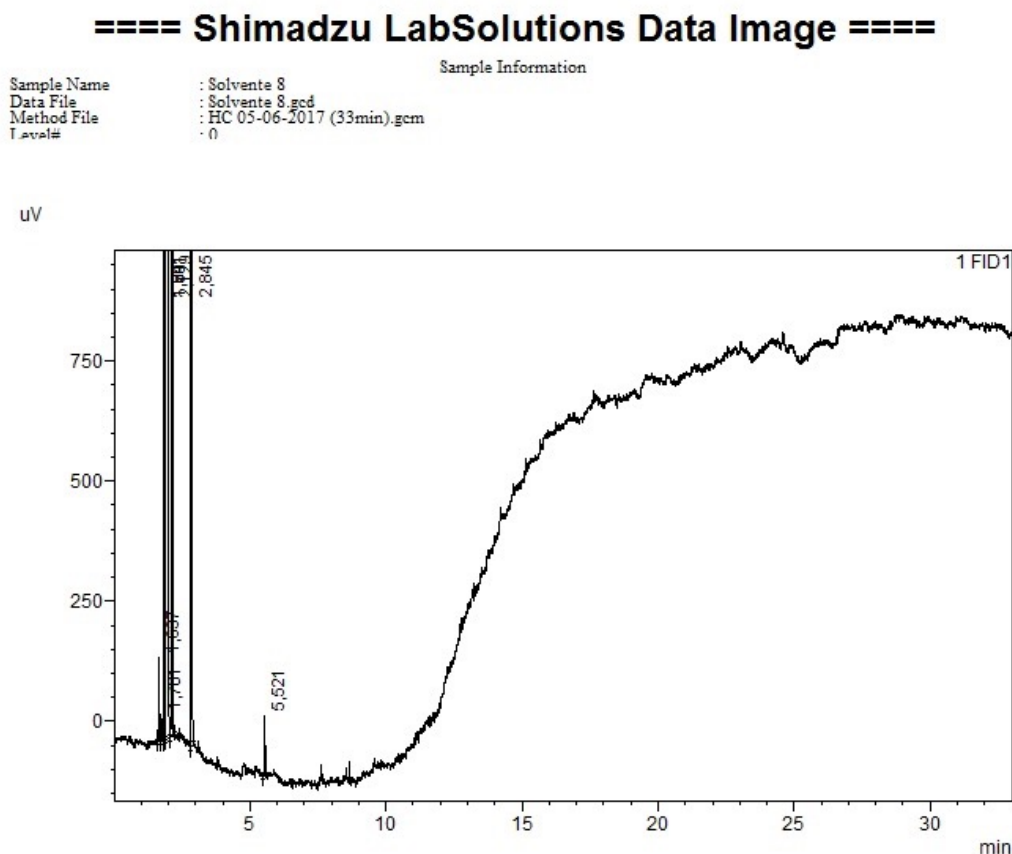


Figura 10 - Cromatograma do solvente de extração com o tempo de leitura de 33 minutos

Com estas afinações, foi possível então passar aos ensaios tendentes à validação do método.

5.2. Validação do Método

5.2.1. Calibração

A calibração é a base para a obtenção dos resultados pretendidos e a sua definição inicia normalmente os procedimentos de validação de um método. Deve verificar um coeficiente de correlação superior a 0,999 garantindo a linearidade dos vários padrões analisados e, obviamente, respeitando a equação matemática $y=ax+b$, com a sendo o declive e b a ordenada na origem.

A gama de trabalho, definida entre 200 e 1000 mg/L, apesar de ser a recomendada para águas residuais na ISO-9377, ¹ não é universal, pois existem outros tipos de águas que necessitam de limites mais baixos. Por exemplo, as águas de consumo humano requerem uma gama que varia entre os 20 mg/L e os 200 mg/L. ⁴¹

Foram criadas várias retas de calibração o que permitiu a elaboração de uma carta de aceitação, onde se obtém um intervalo de valores entre os quais se deve situar o declive obtido diariamente. O estudo pode ser analisado na Figura 11, onde se apresenta um gráfico com os limites definidos pelas linhas a vermelho e os vários declives obtidos.

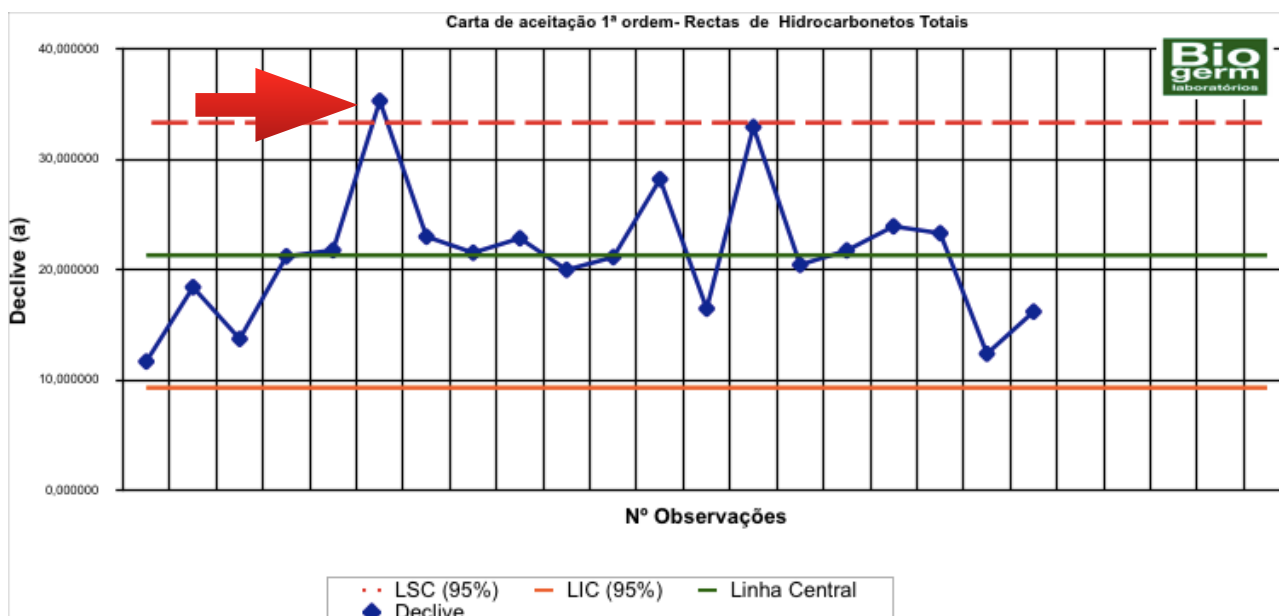


Figura 11 - Estudo da variação dos declives das retas de calibração

Como é possível verificar através da seta a vermelho na Figura 11, existe um ponto que ultrapassa o limite superior definido pelo estudo. Este desvio pode ser utilizado para se perceber a importância do uso de padrões diários, uma vez que naquele dia foram

utilizados os padrões do dia anterior. Esta conclusão também é validada por testes realizados em amostras diesel (Anexo VII), onde se comprova a influência da temperatura da amostra, aumentando não só a área de integração como também a temperatura de ebulição dos compostos. ⁴²

Tal como mencionado anteriormente, a calibração foi engendrada através de uma referência bibliográfica (ISO-9377). ¹ Contudo, foi necessária a sua validação pelo teste de homogeneidade das variâncias dos padrões máximo e mínimo e do teste de PG.

Tabela 20 - Teste de homogeneidade de variâncias para a reta de calibração

	Padrão 1 (200mg/L)	Padrão 5 (1000 mg/L)
Média (mg/L)	200,1	1004,9
Variância	12,7	34,1
Observações	8	8
Teste PG	2,7	
F crítico	3,8	

PG - Teste PG; F crítico - Valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher ³⁵

O teste PG é dado pela razão das variâncias obtidas no padrão 5 e no padrão 1 da reta, tal como se pode verificar na Figura 12.

$$Teste\ PG = \frac{S_{Padrão\ 5}^2}{S_{Padrão\ 1}^2} \quad \text{Equação 10 - Teste PG}$$

O teste de homogeneidade de variâncias permite a obtenção de um valor tabelado, o F crítico e foi realizado com base em oito leituras do padrão mais alto e mais baixo da reta (200 e 1000 mg/L, respetivamente). A conclusão a retirar, com base nos resultados apresentados na Tabela 20, é que a gama de trabalho está devidamente ajustada, uma vez que o valor do teste PG (2,68) é inferior ao F crítico (3,78).

5.2.2. Precisão

De modo a perceber a dispersão dos resultados obtidos por um método analítico é estudada a precisão, nomeadamente através de ensaios de repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia.

5.2.2.1. Estudo de repetibilidade

Os estudos de repetibilidade associados à precisão do método analítico, foram realizados através do padrão intermédio da reta de calibração (Padrão 3 - 600 mg/L) e de uma amostra real, apresentados em seguida.

Tabela 21 - Estudo de repetibilidade do padrão 3 (600 mg/L) e de uma amostra de água residual

	Amostra P3 (600mg/L)	Água residual de uma fábrica de produtos automóveis a montante de uma ETAR
Número de Amostras	11	10
Concentração Média (mg/L)	599,0	2,2
Desvio Padrão (mg/L)	6,9	0,2
Limite de Repetibilidade	19,1	0,5
Coefficiente de Variação	1,1%	8,3%

Este tipo de estudos são uma obrigatoriedade em todos os métodos analíticos, e são aceites com um coeficiente de variação inferior a 10%. Tal como pode ser observado na Tabela 20, este requisito foi cumprido, quer no padrão teste quer na amostra real (no caso uma água residual de uma fabrica de produtos automóveis a montante de uma ETAR). Contudo é importante realçar o aumento significativo do coeficiente de variação (de 1% para 8%), demonstrando que a complexidade das águas residuais criam interferências e dificuldades no sistema de análise. De acordo com os poucos estudos encontrados na literatura verifica-se uma concordância entre os desvios obtidos no padrão intermédio (600mg/L) e num padrão de 50 mg/L, onde se verifica um valor de 2%.⁴¹

5.2.2.2. Estudo de Reprodutibilidade

O estudo de reprodutibilidade assemelha-se em grande parte ao de repetibilidade, excetuando na preparação das amostras e nos reagentes utilizados, ou seja, a amostra teve dez preparações diferentes, utilizando diferentes preparações de solvente de extração e ainda diluições, uma vez que as amostras em causa ultrapassam a concentração máxima em TPH definida na gama de calibração. As amostras utilizadas neste estudo são provenientes das águas residuais de uma fábrica de produtos automóveis e foram colhidas por um técnico de amostragem, devidamente qualificado, pertencente aos quadros da Biogerm.

Tabela 22 - Estudo de reprodutibilidade de amostras de águas residuais

	Esgoto de uma fábrica de produtos automóveis (Anexo VIII)	Água residual de uma fábrica de produtos automóveis a jusante de uma ETAR
Número de Amostras	11	10
Concentração Média (mg/L)	7,1	3,4
Desvio Padrão (mg/L)	0,3	0,3
Limite de Repetibilidade	0,8	0,7
Coefficiente de Variação	4,1%	7,8%

Como é possível observar na Tabela 21, este é mais um estudo de validação concluído com sucesso, uma vez que também se obteve coeficientes de variação inferiores a 10%.

5.2.2.3. Precisão Intermédia

A precisão de um método analítico pode ainda ser avaliada pelos resultados obtidos nos padrões independentes, mais concretamente pelos padrões de concentração mais baixa (0,2 mg/L), intermédia (0,6 mg/L) e mais alta (1,0 mg/L) da reta de calibração. O teste baseia-se no cálculo do desvio padrão e do coeficiente de variação obtidos em dez réplicas e permite a definição dos algarismos significativos que podem ser emitidos para o cliente. Esta pode ser baseada em três fatores: para além da precisão intermédia, pode ainda regular-se pelas normas orientadoras, caso existam, e ainda através da incerteza relativa.

Tabela 23 - Precisão intermédia dos padrões 1, 3 e 5 da reta de calibração

Padrão	Valor alvo (mg/L)	Concentração média (mg/L)	Coefficiente de variação (%)	Desvio padrão (mg/L)	2 X Desvio padrão
Padrão 1 (LQ)	0,20	0,20	5,73	0,01	0,02
Padrão 3	0,60	0,59	5,52	0,03	0,06
Padrão 5	1,00	0,98	5,67	0,06	0,12

Através dos resultados apresentados na Tabela 22, pode concluir-se que todos os valores compreendidos entre 0,2 e 0,6 mg/L podem ser emitidos com dois algarismos significativos, enquanto que entre 0,6 e 1,0 mg/L os resultados têm de ser emitidos com apenas um algarismo significativo (Tabela 23), uma vez que se verificam um desvio padrão inferior e superior a 0,05, respetivamente. Estes valores serão objeto de confirmação mais adiante, aquando do cálculo da incerteza.

Tabela 24 - Casas decimais definidas na precisão intermédia

Gama de Valores	Algarismos significativos
0,2 mg/L - 0,6 mg/L	2
0,6 mg/L - 1,0 mg/L	1

A norma orientadora deste método analítico (ISO - 9377 ¹) faz referência à emissão de resultados, definindo que para valores <10 mg/L os resultados são expressos com dois algarismos significativo tal como para valores >10 mg/L são arredondados à unidade. Esta ferramenta funciona apenas como estudo inicial, uma vez que após calculadas as incertezas do método, os arredondamentos definidos aqui poderão não fazer sentido, caso estas sejam elevadas.

5.2.3. Exatidão

O cálculo da exatidão permite perceber se os resultados obtidos pelo método são ou não concordantes com os valores de referência. Normalmente, no laboratório de química da Biogerm a exatidão é obtida através de resultados alcançados em ensaios interlaboratoriais. Contudo, durante o desenvolvimento deste método não foi possível a utilização destes ensaios, o que levou ao cálculo da exatidão através de dois parâmetros: ensaios de recuperação (nos quais se adiciona uma concentração conhecida de padrão –

neste caso 0,5 mg/L – e se verifica qual a concentração obtida no final do processo analítico) e comparação de resultados obtidos por subcontratação a laboratórios acreditados e os obtidos pelo método implementado na Biogerm.

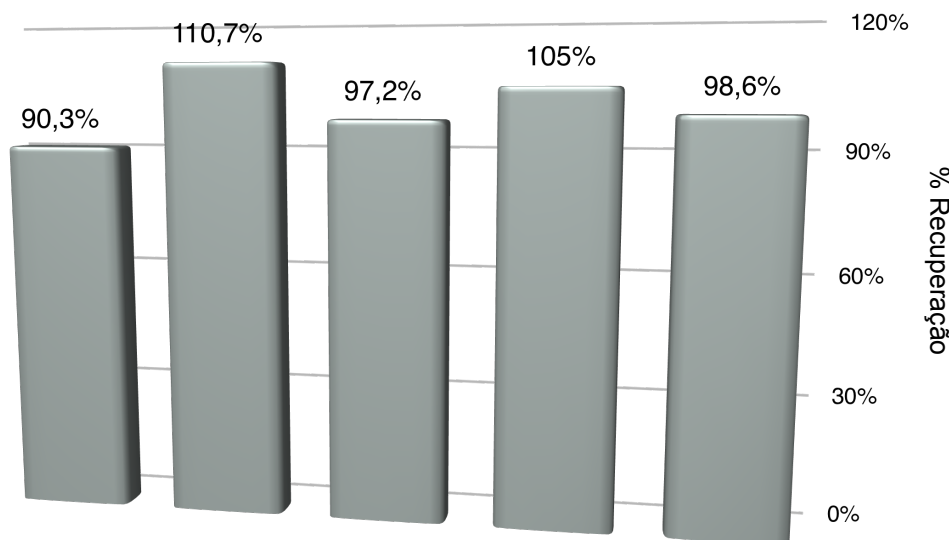


Figura 12 - Percentagem de recuperação obtida nas amostras adicionadas com padrão 0,5 mg/L

O critério de aceitação das recuperações está estipulado internamente, com 15% de erro, ou seja, valores entre 85 e 115%. Como se pode verificar na Figura 13, todas as recuperações estão dentro dos limites estipulados.

Em relação à comparação de resultados, o método de análise de hidrocarbonetos subcontratado é a gravimetria, o que significa que o LQ é de 5 mg/L e os resultados são arredondados à unidade. No entanto, é possível estabelecer uma comparação para amostras com valores mais elevados, como é o caso de uma amostra colhida na caixa de visitas de uma fábrica produtora de material automóvel. A Tabela 24 demonstra a concordância dos resultados, com um erro relativo de apenas 1,4%. Esta concordância pode ser verificada pelo Anexo IX onde está disponível o documento comprovativo do valor de hidrocarbonetos, obtido nos laboratórios do ISEP, por um método de análise devidamente acreditado pelo IPAC.

Tabela 25 - Comparação dos resultados do índice de hidrocarbonetos em óleo

	Tipo de Análise	Valor	Unidades	Erro Relativo
Biogerm, S.A.	Cromatografia Gasosa	7,1	mg/L	1,4%
ISEP	Gravimetria	7,0	mg/L	

5.2.4. Incerteza

A incerteza associada ao resultado final obtido é o intervalo de valores aceite para esse mesmo resultado, e calculado, neste caso, com base nos valores obtidos nos ensaios de precisão e exatidão do método.³⁸ Nos primeiros, utilizou-se o estudo de reprodutibilidade efetuado em amostras reais, enquanto na exatidão houve a adição de uma concentração conhecida na amostra (ensaio de recuperação). Deste modo, foi possível obter os resultados apresentados na Tabela 25.

Tabela 26 - Valor da incerteza associada ao método analítico

	Valor	Valor (%)
Incerteza associada às recuperações	0,00017	-
Incerteza associada à precisão	0,03134	-
Incerteza Combinada	0,03134	-
Incerteza Expandida	0,06269	-
Incerteza Relativa	-	12,5

O valor obtido na incerteza expandida delimita o intervalo de valores em que o resultado emitido pode ser considerado correto, atendendo ao nível de confiança de 95%.³⁸ Já a incerteza relativa é calculada com base na incerteza expandida, indicando o valor em percentagem associada ao método. O valor obtido (12,5%) é uma incerteza aceitável atendendo a que a base de comparação, o método de gravimetria executado no ISEP, se situa nos 25%. (Anexo IX)

Como foi referido acima, também a incerteza relativa permite definir o número de algarismos significativos que o resultado contém. A incerteza relativa é mais fidedigna que o parâmetro da precisão intermédia, atendendo que envolve um parâmetro da precisão (duplicados de amostras) e ainda um parâmetro da exatidão (recuperação). Quando

comparada com a norma orientadora apresenta-se mais realista, uma vez que é definida com recurso a amostras reais. Assim sendo, a Tabela 26 corrige a estimativa inicial apresentada na Tabela 23 para as casas decimais que o resultado a apresentar ao cliente deve possuir.

Tabela 27 - Casas decimais definidas pela incerteza relativa

Gama de valores	Arredondamento
0,2 mg/L - 0,4mg/L	2 casas decimais
0,4 mg/L - 4 mg/L	1 casa decimal
> 4 mg/L	Unidade

5.2.5. Testes em amostras reais

A implementação deste método analítico não se limitou apenas à análise de padrões referência. A aplicação em amostras naturalmente contaminadas é essencial para completar a validação, uma vez que se um método que cumpre todos os outros preceitos de validação não é capaz de quantificar os níveis presentes no meio ambiente, não pode ser uma opção séria. Como já foi referido, foram incluídas amostras de águas residuais reais nos ensaios de reprodutibilidade e repetibilidade com resultados aceitáveis.

Apesar de não ter sido possível efetuar uma amostragem extensa, decidiu-se aprofundar um pouco este estudo, que viria a contribuir não só para a validação do método em si, mas também para uma melhoria das condições iniciais do protocolo. Foram utilizadas três amostras de duas fábricas produtoras de peças automóveis. Numa delas, duas amostras foram colhidas de forma automática e contínua durante 24h, na parte final do tratamento (efluente), a montante e a jusante da ETAR colocada no final do processo, para que se perceba também a eficiência do tratamento dos TPH. A terceira amostra, proveniente de uma outra fábrica, foi uma amostra pontual, realizada na caixa de esgoto da fábrica por um técnico devidamente qualificado e foi utilizada para a demonstração da importância de preservação das amostras logo que chegam ao laboratório.

Nas primeiras análises a amostras reais efetuadas neste novo método, as diferenças verificadas entre os valores obtidos e os valores subcontratados foram significativas e sempre por defeito (Figura 13). Atendendo que os hidrocarbonetos são compostos que se degradam, ¹ através de microrganismos por exemplo, essa poderia ser

uma das justificações para a acentuada diferença verificada. Os resultados apresentados permitem concluir que à medida que os dias passam a concentração de hidrocarbonetos vai-se alterando, uma vez que o intervalo de tempo entre o dia da colheita e o dia da análise na amostra 1 é de vinte e cinco dias (havendo uma diferença de cerca de 5 vezes na concentração medida na Biogerm) e na amostra 2 é de três dias apenas (e essa diferença é reduzida para menos de metade do valor medido no laboratório subcontratado).

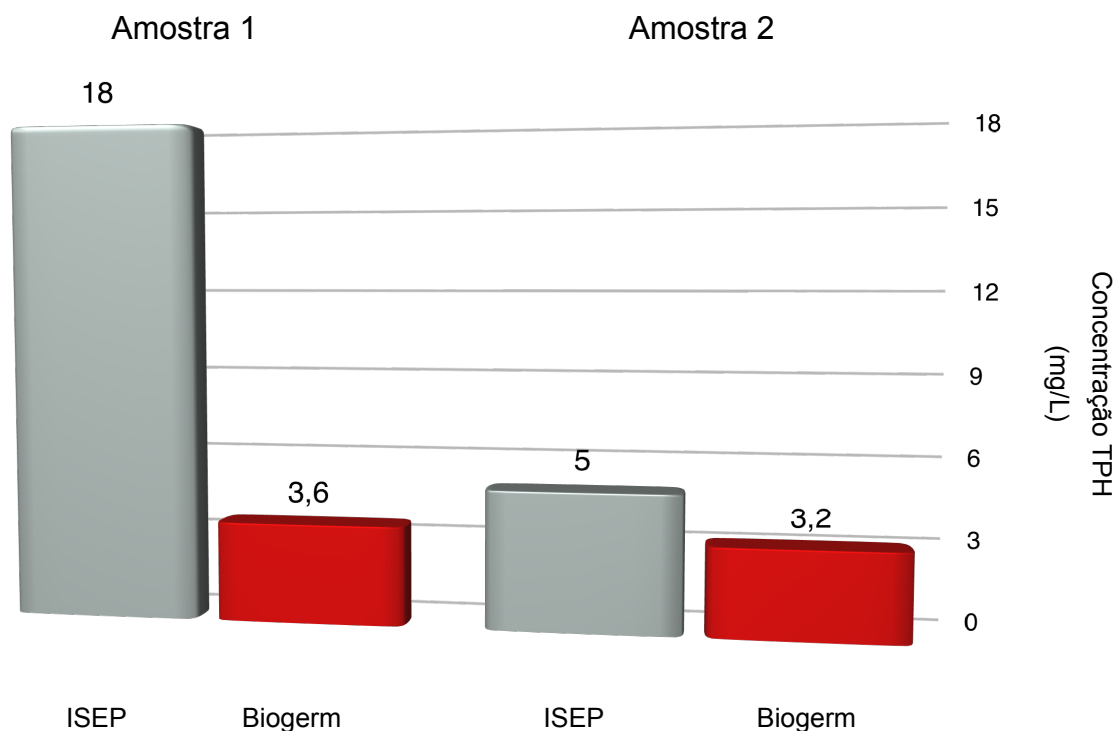


Figura 13 - Valores comparativos obtidos em cromatografia gasosa na Biogerm e no ISEP através de gravimetria para a análise do índice TPH em duas águas residuais.

De forma a perceber mais concretamente o efeito da preservação, foi efetuado um estudo numa amostra de água residual em que se compara o valor obtido nos ensaios de reprodutibilidade (Biogerm), o valor enviado pelo subcontratado (ISEP), e os valores obtidos numa leitura posterior, aproximadamente duas semanas após a chegada da amostra ao laboratório, em que uma delas não tinha qualquer pré-tratamento e outra estava devidamente preservada, a pH <2. Como se pode verificar na Figura 14, a importância da preservação é crucial, uma vez que a degradação ocorre e de forma bastante acentuada. No fundo, esta análise confirma o já verificado na Figura 13.

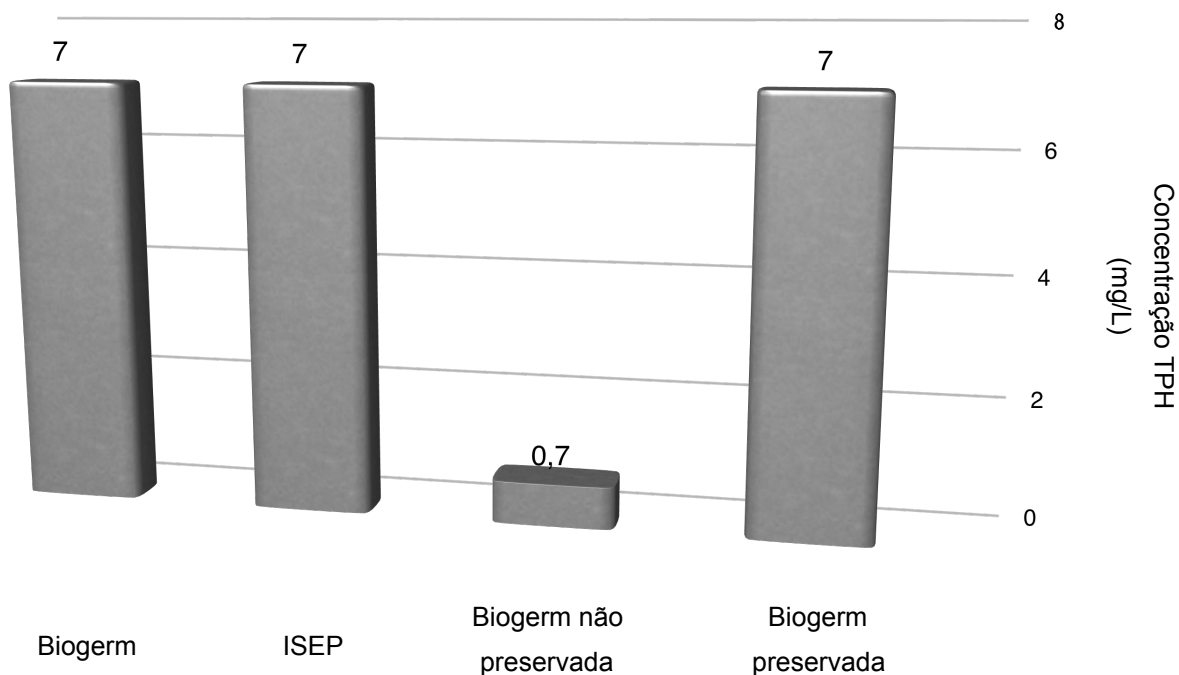


Figura 14 - Gráfico comparativo de amostras preservadas e não preservadas

Posteriormente, surgiu a possibilidade de analisar a eficiência de uma ETAR, colocada no final de um processo de produção de produtos automóveis. A Figura 15 mostra um decréscimo de aproximadamente 35% da concentração de TPH da amostra recolhida a jusante da ETAR, em relação à tomada a montante (2,2 e 3,4 mg/L). Com base nos resultados pode concluir-se que aparentemente há uma certa eficácia na redução do TPH, embora não tenha sido possível obter informações sobre o tipo de tratamento e os principais objetivos associados. Apesar disso o valor que se verifica a jusante da ETAR ainda se mantém acima do valor referenciado (1,9 mg/L) ²⁷ para locais onde se encontram empresas petrolíferas, apesar de não ser este exatamente o caso.

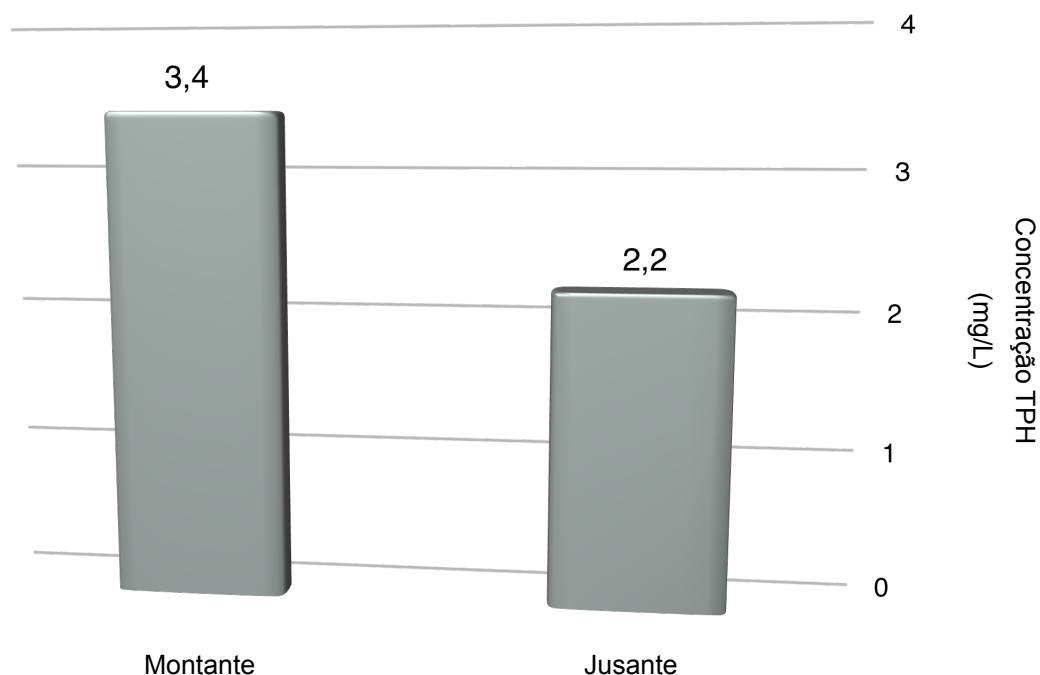


Figura 15 - Comparação do índice de TPH de amostras de águas residuais a montante e a jusante de uma ETAR

Os resultados obtidos durante todo o processo de desenvolvimento e implementação do método e a sua respetiva validação são satisfatórios, tanto para amostras de padrões como para amostras reais. Nestas últimas, contudo, foram ainda encontradas algumas dificuldades no tratamento, nomeadamente na passagem do recipiente de mistura para as ampolas de decantação, uma vez que o solvente de extração e os compostos orgânicos são bastante voláteis. Isto levou à tentativa, bem-sucedida, de efetuar todo o processo de extração no interior da ampola de decantação, para que fossem diminuídas as referidas perdas.

6. Conclusão

Após todo o trabalho desenvolvido, nomeadamente, todos os testes e análises realizados, pode concluir-se que o método foi implementado e validado com sucesso. Apesar disso, será ainda necessário a inclusão e respetivos bons desempenhos em ensaios interlaboratoriais para que se possa requisitar a auditoria e consequente acreditação do método. Esta vertente não foi conseguida ainda durante o processo de implementação e da duração desta dissertação, devido a escassez de tempo e recursos.

Os principais obstáculos verificados neste processo foram a forma de integração, que difere bastante dos métodos tradicionais de cromatografia bem como a preparação da amostra, nomeadamente na fase de extração, que devido à volatilidade dos hidrocarbonetos é suscetível a perdas significativas. Por fim, a definição da gama de trabalho também foi um desafio, uma vez que nem sempre a definição dos picos é perfeita, o que dificultou a definição dos tempos de retenção dos hidrocarbonetos C₁₀ e C₄₀. A formação relativa a hidrocarbonetos e cromatografia gasosa revelou-se de extrema importância, pois permitiu uma melhor compreensão na forma de integração dos picos, bem como no manuseamento das amostras para a análise deste tipo de compostos.

A otimização dos métodos analíticos é um processo constante, isto é, à medida que o técnico de laboratório realiza a preparação das amostras e a análise cromatográfica pode e deve ter uma visão crítica, percebendo quais os pontos que poderão ser melhorados. Durante a implementação deste método, foram reduzidas as transferências entre recipientes de modo a diminuir perdas do analito e também as possíveis fontes de contaminação, realizando a extração na ampola de decantação.

Os resultados obtidos nesta dissertação são bastante aceitáveis, quer na análise de padrões quer de amostras reais. Obteve-se uma resposta concordante do sistema, isto é, coeficientes de variação inferiores a 10%. Em relação à incerteza relativa (12,5 %), foi um resultado de referência, uma vez que se situa em metade do atualmente utilizado e emitido no método subcontratado (25%), apesar de este ser gravimétrico. Por fim, os resultados em amostras reais permitem constatar a importância da preservação da amostra, uma vez que se verificou um elevado decréscimo do valor de TPH.

A finalizar, é importante referir que este foi um projeto desenvolvido num âmbito pouco estabelecido em Portugal, na qual a Biogerm, S.A. tem o maior interesse e aposta forte. Os resultados obtidos são satisfatórios e permitem concluir que esta dissertação foi uma mais-valia não só para a empresa, mas também para a mais correta e abrangente monitorização dos teores de TPH em águas residuais em Portugal.

7. Bibliografia

- ¹ International Standard Organization, “ISO-9377-2 Water quality - determination of hydrocarbon oil index - Method using solvent extraction and gas chromatography”, Genebra, Outubro 2000.
- ² Petroleum Geoscience Technology, 2017. “Geologia do petróleo - PGT”, https://albertowj.files.wordpress.com/2010/03/geologia_do_petroleo.pdf (acedido em 14/06/2017)
- ³ B. P. Tissot, D. H. Welte, “Petroleum formation and occurrence - Second revised and enlarged edition”, Springer-Verlag, Berlim, 1984.
- ⁴ S. D. Williams, D. E. Ladd, J. J. Farmer, “Fate and transport of petroleum hydrocarbons in soil and ground water at Big South Fork national river and recreation area, Tennessee and Kentucky, 2002-2003”, U.S. Geological Survey, Virginia, 2006.
- ⁵ Agency for Toxic Substances & Disease Registry, “Public health statement for benzene”, Division of toxicology and environmental medicine, Atlanta, Agosto 2007.
- ⁶ C. R. Martins, W. A. Lopes, J. B. de Andrade, “Solubilidade das substâncias orgânicas”, Quim. Nova, 36, 1248-1255, 2013.
- ⁷ S. Bano, “Pharmaceutical Chemistry - Alkanes, alkenes, alkynes, alkyl halides, alicyclic hydrocarbons, alcohols, ethers and epoxides, aldehydes and ketones, carboxylic acids and their functional derivatives”, Faculty of Science, New Delhi, India, 2007.
- ⁸ L. G. Wade Jr., “Organic chemistry - 7th edition (Chapter 3 - Structure and stereochemistry of alkanes)”, Prentice Hall, Fevereiro 2010.
- ⁹ U.S. Department of Health and Human Service, “Toxicological profile for total petroleum hydrocarbon (TPH)”, Public Health Service, Atlanta, September, 1999.
- ¹⁰ Galp Energia, <http://www.galpenergia.com/PT/agalpenergia/os-nossos-negocios/Refinacao-Distribuicao/ARL/Refinacao/Paginas/Didatico-Refinacao.aspx> (acedido em 17/05/2017)
- ¹¹ Institut national de santé publique, “Public health issues related to gas and oil hydrocarbon exploration and production”, Environmental health and toxicology branch and biological risks and occupational health branch, Março 2015

-
- ¹² F. Leusch, M. Bartkow, "A short primer on benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) in the environment and in hydraulic fracturing fluids", Griffith University – Smart Water Research Centre, Queensland, Austrália, Novembro 2010.
- ¹³ Ki-H. Kim, S. A. Jahan, E. Kabir, R. J. C. Brown, "A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects", *Environment International*, 60, 71-80, Outubro 2013.
- ¹⁴ Ministério do Ambiente, "Decreto-Lei N. 236/98", *Diário da República*, Agosto 1998.
- ¹⁵ Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, "Decreto-Lei n. 276/2009", *Diário da República*, Outubro 2009.
- ¹⁶ Ministério da Economia, "Decreto-Lei N. 103/2015", *Diário Da República*, Junho 2015.
- ¹⁷ Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, "Decreto-Lei N.183/2009", *Diário da República*, Agosto 2009.
- ¹⁸ Comissão das Comunidades Europeias, "Regulamento (CE) n. 1881/2006 da comissão", *Jornal Oficial da União Europeia*, Dezembro 2006.
- ¹⁹ A. D. Eaton, L. S. Clesceri, E. W. Rice, A. E. Greenberg, "Standard of methods - for the examination of water and wastewater - 21st edition", Centennial Edition, Washington, USA 2005.
- ²⁰ M. J. M. Wells, "Sample preparation techniques in analytical chemistry - Principles of Extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids", Department of Chemistry, Tennessee Technological University, 2003.
- ²¹ R. P. W. Scoot, "Principles and practice of chromatography", Book 1, Library4Science, Janeiro 2002
- ²² J. D. Roberts, M. C. Caserio, "Basic principles of organic chemistry, second edition", W. A. Benjamin Inc., Junho 1977.
- ²³ H. M. McNair, A. M. Miller, "Basic gas chromatography - techniques in analytical chemistry", Wiley-Interscience, Nova Iorque, 1997.
- ²⁴ www.chromacademy.com, (acedido em 22/05/2017)
- ²⁵ British petroleum, "BP Statistical review of world energy", Londres, Junho 2016

-
- ²⁶ G.O. Adewuyi R A Olowu, “Assessment of oil and grease, total petroleum hydrocarbons and some heavy metals in surface and groundwater within the vicinity of NNPC oil depot in apata, ibadan metropolis, nigéria”, international journal of recent research and applied studies, Índia, Outubro 2012.
- ²⁷ Associação Portuguesa de Empresas Petrolíferas, “Benchmarking legal e metodológico para a proteção de solos e águas subterrâneas - Contaminação por produtos petrolíferos”, Lisboa, Dezembro 2013.
- ²⁸ Associação Portuguesa de Empresas Petrolíferas , “Guia setorial para a proteção e remediação de solos e águas subterrâneas no setor petrolífero”, Lisboa, Julho 2016.
- ²⁹ Spectro Scientific, “Techniques for measuring oil in water”, Chelmsford, UK, Maio 2016.
- ³⁰ <http://www.ipac.pt/pesquisa/acredita.asp> (acedido em 01/05/2017)
- ³¹ appslab.thermofisher.com (acedido em 05/06/2017)
- ³² A. Caruso, “Hydrocarbon oil index determination in water using a simple, cost-effective system”, Thermo Fisher Scientific, Itália, 2015
- ³³ J. M. Miller, “Chromatography: concepts and contrasts - Second Edition”, Wiley, Nova Jersey, 2009.
- ³⁴ R. P. W. Scott, “Gas chromatography detectors”, Lybrary4Science, 2003.
- ³⁵ Guia RELACRE 13, “Validação de métodos internos de ensaio em análise química”, Relacre, Lisboa, Fevereiro 2000.
- ³⁶ Guia RELACRE 3, “Validação de resultados em laboratórios químicos”, Relacre, Lisboa, Janeiro 1996.
- ³⁷ A. Alves, “Apontamentos de métodos instrumentais de análise”, Departamento de Engenharia Química, Porto, 2016.
- ³⁸ Guia Eurachem/RELACRE 1, “Exemplos de cálculos de incertezas”, Relacre, Lisboa, Setembro, 2002.
- ³⁹ Instituto Português de Acreditação, “OCG007 - Guia para a quantificação de Incertezas em ensaios químicos”, Lisboa, Janeiro 2007.
- ⁴⁰ International Standard Organization, “Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data”, Genebra, Julho 2012

⁴¹ F. Munari, A. Cadoppi, T. Aasoldsen, “Ultra fast GC method for the analysis of total hydrocarbons in water in compliance with ISO 9377-2 (Mod.)”, Thermo Fisher Scientific Inc., Milão, Dezembro 2006

⁴² Regenox, “Total Petroleum Hydrocarbon Analysis: Analytical Challenges and Recommendations”, www.regenesis.com (acedido em 10/06/2017)

Anexos

Anexo I - Tabela representativa de hidrocarbonetos, que relaciona o número de átomos de carbono, o seu ponto de ebulição 1 e o estado físico associado 2.

Número de átomos de Carbono	Ponto de Ebulição (°C)	Estado Físico	Número de átomos de Carbono	Ponto de Ebulição (°C)	Estado Físico
2	-89	Gás	24	391	Líquidos Viscosos ou Sólidos
3	-42		25	402	
4	0		26	412	
5	36	Líquido	27	422	
6	69		28	432	
7	98		29	441	
8	126		30	450	
9	151		31	459	
10	174		32	468	
11	196		33	476	
12	216		34	483	
13	235		35	491	
14	253		36	498	
15	271		37	505	
16	287	Líquidos Viscosos ou Sólidos	38	512	
17	302		39	518	
18	317		40	525	
19	331		41	531	
20	344		42	537	
21	356		43	543	
22	369		44	548	
23	380				

Anexo II - Avaliação quantitativa do risco e comparação entre colunas compactadas e capilares utilizadas em GC

Avaliação Quantitativa do Risco

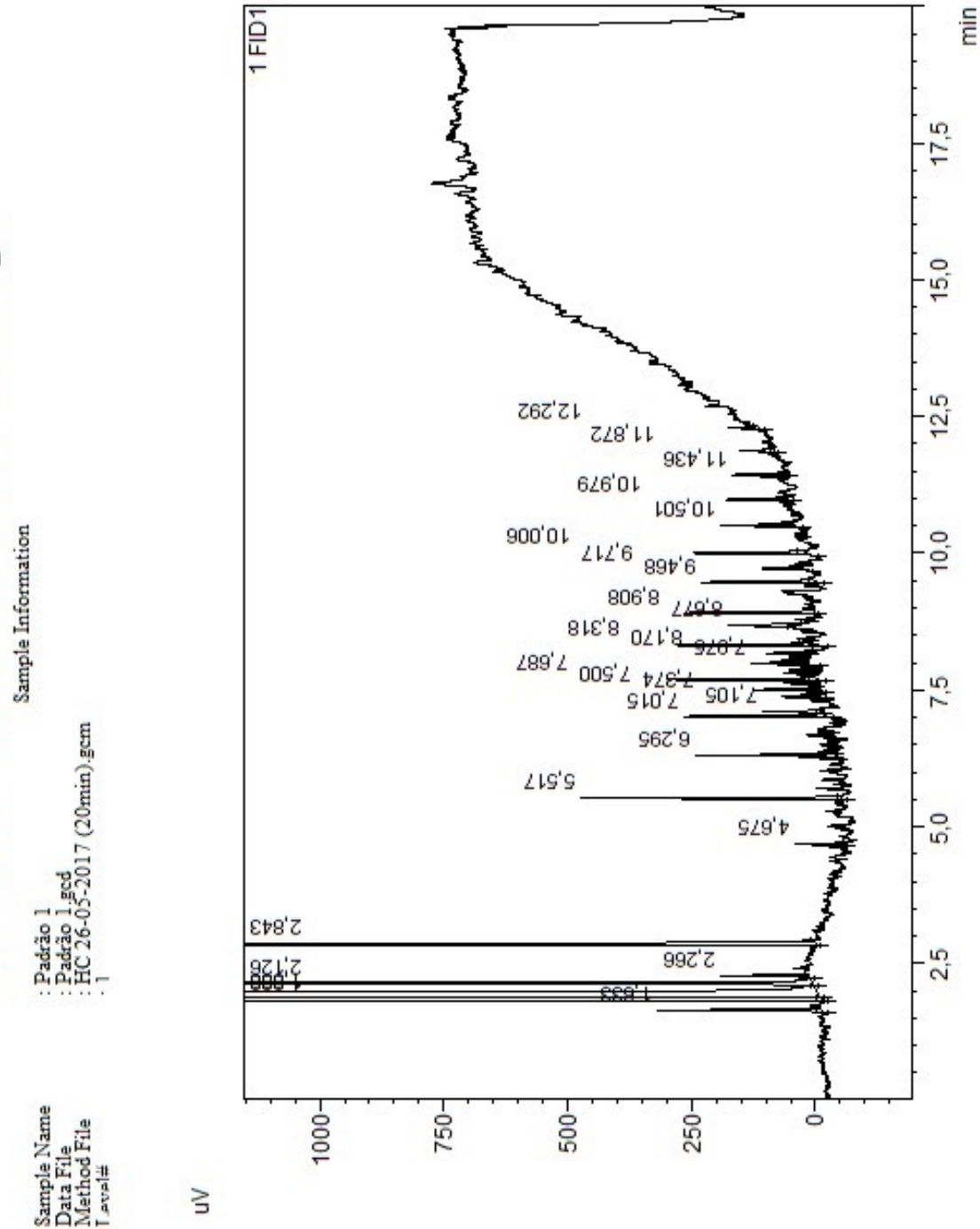
Saúde Pública	Ecossistemas
Análise Toxicológica	Identificação de Recetores
Avaliação da Dose-Resposta	Análise de Exposição
Avaliação da Exposição	Caracterização do Risco
Caracterização do Risco	
Análise de Incerteza	
Níveis de Risco	

Comparação entre Colunas Compactadas e Capilares utilizadas em GC

	Compactadas	Capilares
Diâmetro Interno	3,2 mm	0,40 mm
Diâmetro Externo	2,2 mm	0,25 mm
Espessura Interior	0,5 um	0,25 um
Comprimento	0,15 - 2 m	15 - 60 m
Fluxo Máximo	20 mL/min	1 mL/min

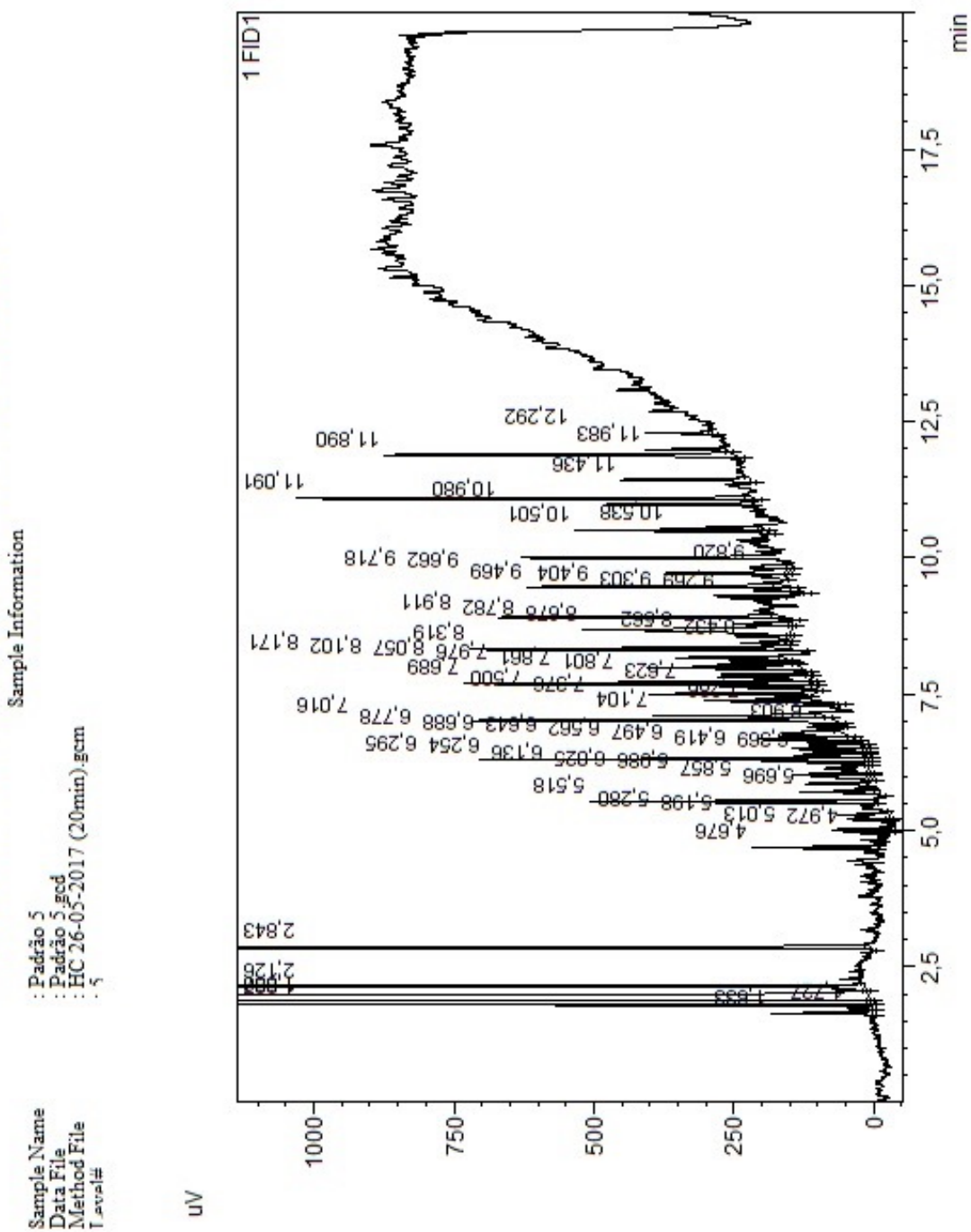
Anexo III - Cromatograma do padrão 1 (concentração mais baixa), 200 mg/L.

==== Shimadzu LabSolutions Data Image ====



Anexo IV - Cromatograma do padrão 5 (concentração mais alta), 1000 mg/L

==== Shimadzu LabSolutions Data Image ====



Anexo V - Instruções de trabalho vigentes na Biogerm,
S.A.

Determinação do Índice de Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (TPH) por Cromatografia Gasosa (GC)

Versão 01

Responsável do processo :Direção do Laboratório de Química

Autoria : Diretor do Laboratório de Química

Aprovação : Direção Executiva

Data de entrada em vigor :

Domínio de aplicação : Colaboradores do laboratório de química

Conteúdo :

Âmbito.....	2
Interferências.....	2
Equipamento	2
Reagentes	2
Preparação do Solvente de Extração.....	3
Preparação de Amostras e Procedimento de Análise	3
Preparação de Recuperações	3
Condições Experimentais no GC.....	4
Preparação da Curva de Calibração.....	4
Resultados	4
Controlo de Qualidade.....	5
Registos	5

Anexos :

- Esta IT não tem anexos

Referências :

Abreviaturas :

- DLQ Diretor do Laboratório de Química

Aprovação e Registo de Versões :

Versão	Data	Autoria	Validação pelo Diretor da Qualidade		Aprovação	
		Nome	Data	Nome	Data	Nome
01		Daniela Barros		Olga Magalhães		António Araújo
		Assinatura		Assinatura		Assinatura

Nada a registar

Este procedimento aplica-se à determinação do índice de óleos em hidrocarbonetos em águas residuais, utilizando a técnica de cromatografia gasosa (GC – Gas Chromatography).

2. Interferências

Compostos de baixa polaridade e elevadas concentrações de substâncias polares podem ser um fator interferente na análise de hidrocarbonetos por cromatografia gasosa.

As possíveis emulsões que se verifiquem na amostra podem ser um fator de interferência na fase de extração.

3. Equipamento

DLQ ou Técnico**3.1.** Agitador magnético**3.2.** Balança digital de Laboratório**3.3.** Balança Analítica**3.4.** Concentrador de Azoto**3.5.** GC

4. Reagentes

DLQ ou Técnico**4.1.** n - pentano**4.2.** n - decano**4.3.** n - Tetracontano**4.4.** Florisil**4.5.** Sulfato de Magnésio Heptahidratado, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ **4.6.** Ácido Sulfúrico, H_2SO_4 **4.7.** Mistura de Óleos Minerais**4.8.** Acetona

O solvente de extração utiliza-se na fase de extração do analito da amostra, para que se reúnam as condições necessárias para a determinação por cromatografia gasosa, nomeadamente o ponto de ebulição compreendido entre os 36°C e os 69 °C. A sua preparação é realizada pelos técnicos de laboratório e processa-se da seguinte forma.

- Dissolver 20 mg de n-Tetracontano em n-Pentano
- Adicionar 10 µL de n-Decano
- Perfazer os 1000 ml com n-pentano

6. Preparação de Amostras e Procedimento de Análise

DLQ ou Técnico

As amostras são preservadas através da sua acidificação, com recurso a H₂SO₄ (1+1), até atingir o pH<2, de modo a conservar as características iniciais da amostra.

- Pesar a massa do recipiente onde a amostra está contida.
- Adicionar 50 ml de solvente de extração a 900 ml de amostra.
- Agitar a amostra, no mínimo, 30 minutos com recurso a um agitador magnético.
- Colocar a amostra numa ampola de decantação e esperar a devida separação.
- Pesar o recipiente vazio onde a amostra foi colhida.
- Retirar o sobrenadante para um recipiente de 50 ml, filtrando-o através de uma camada de 2g de florissil.
- Utilizar um concentrador de azoto para reduzir o volume de 50 ml para 5 ml, aproximadamente, e transferi-lo para um tubo de 10 ml graduado.
- Utilizar novamente o concentrador de azoto e reduzir a amostra até 1 ml, aproximadamente.
- Passar a amostra para os vials.
- Colocar os vials no autosampler e proceder à análise cromatográfica.

Nota:

Caso sejam verificadas emulsões durante o processo de agitação adiciona-se sulfato de magnésio, de modo a diminuir não só as emulsões como também influências que estas possam ter na análise.

7. Preparação de Recuperações

DLQ ou Técnico

A solução necessária para a realização das recuperações é realizada com 50% do padrão 5 (Ponto 9) e 50% de Acetona. Medir 2ml desta solução para os 900ml de amostra e proceder à extração conforme descrito no ponto 6.

Direção do Laboratório de Química 8. Condições Experimentais no GC

Página 4 de 5
DLQ ou Técnico

Temperatura do injetor: 340°C

Fluxo total: 80 mL/min

Volume injetado de amostra: 1 µL

Coluna: TG – 5SILMS Thermo

Comprimento: 30m

Diâmetro Interno: 0.25mm

Detetor: Detetor de Ionização por Chama (FID)

Temperatura Inicial da coluna: 40 °C

Tempo: 1 min

Aumento da temperatura: 25 °C/min

Tempo: 12 min

Temperatura final da coluna: 340 °C

Tempo: 20 min

Detetor: Detetor de Ionização por Chama (FID)

Temperatura do detetor: 350 °C

Tempo: 33 min

9. Preparação da Curva de Calibração

DLQ ou Técnico

Preparar o padrão 5 através da pesagem de 0,1 g da solução mãe comercializada (4.7) para 100 ml do solvente de extração, e através desta solução realizar os restantes padrões com base nas seguintes diluições apresentadas na tabela.

P5	P4	P3	P2	P1
Leitura Direta	20:25	15:25	10:25	5:25

A reta de calibração é aceite se o coeficiente de correlação for $r \geq 0,999$ e o declive aceite por carta.

10. Resultados

DLQ ou Técnico

A concentração de hidrocarbonetos é determinada por interpolação de uma curva diária, de primeira ordem, com a gama de trabalho definida entre os 200 mg/L e os 1000 mg/L. No caso das amostras, devido ao procedimento no tratamento da amostra é necessário a realização do

cálculo apresentado de seguida. É importante referenciar que após o cálculo efetuado os limiares sofrem alteração, nomeadamente o LQ que passa a ter um valor de 0,2 mg/L devido à concentração da amostra bem como o valor mais alto sem diluição passa a 1 mg/L.

$$\rho = \frac{(A_m - b) \cdot f \cdot V \cdot w}{a \cdot (m_1 - m_2)}$$

ρ – Índice do óleo de Hidrocarbonetos (mg/L)

A_m – Área dos picos integrados

b – Ordenada na origem da reta de calibração

f – Fator de diluição

V – Volume do extrato final colocado no vial (ml)

w – Densidade de amostra, usualmente 1g/ml correspondente à densidade da água.

a – Declive da reta de calibração

m_1 – Massa do recipiente com amostra

m_2 – Massa do recipiente sem amostra

11. Controlo de Qualidade

DLQ ou Técnico

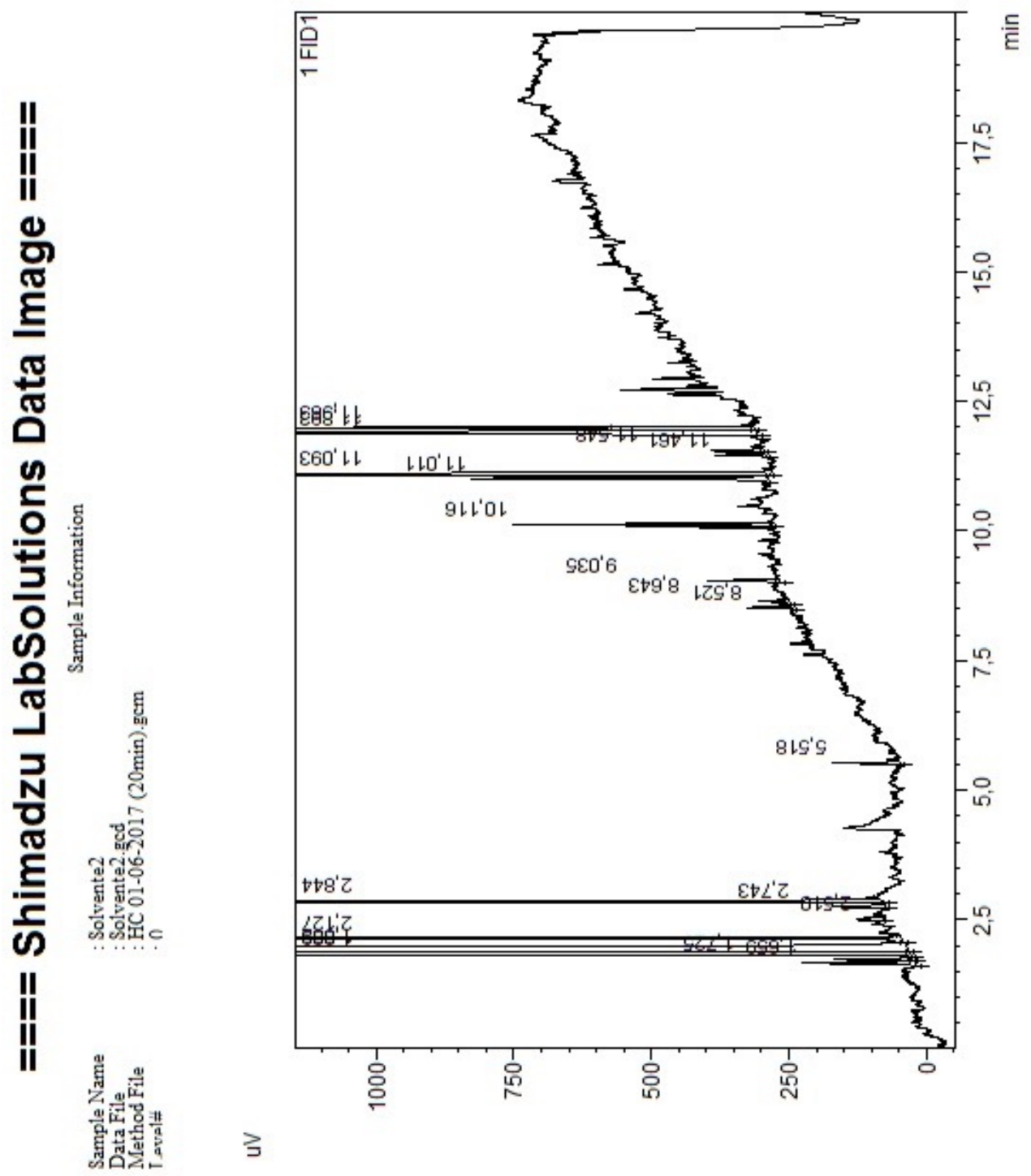
O controlo da calibração é feito por um padrão, após a leitura de cada 10 amostras, com uma concentração compreendida entre os 40% e os 80% da gama de trabalho e o resultado não poderá exceder os 10% de erro. O solvente de extração também será lido a cada 10 amostras para que seja possível a verificação de alguma contaminação e também para corrigir alguma alteração verificada na linha de base.

12. Registos

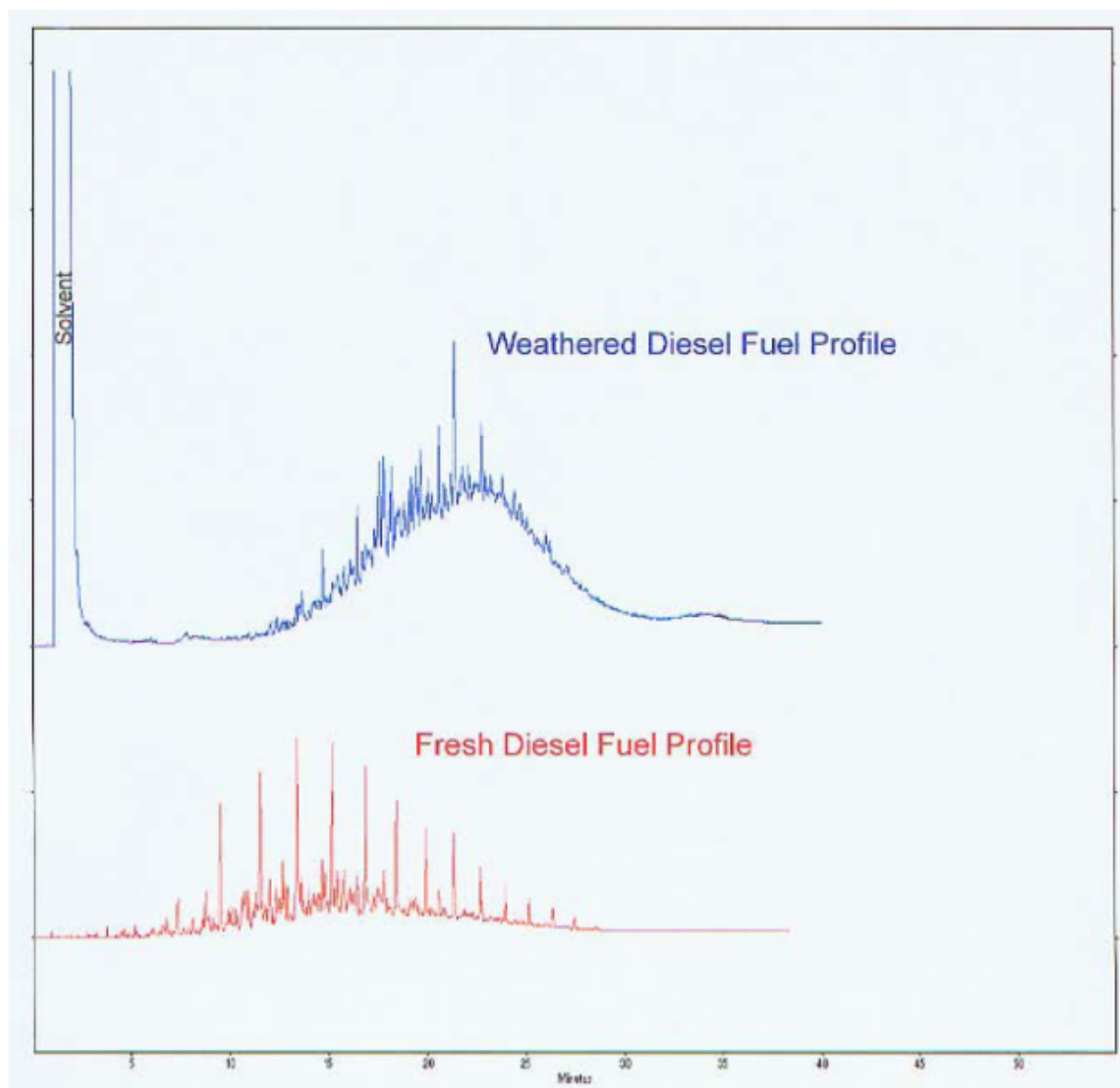
DLQ ou Técnico

Registo	Local de arquivo	Tempo de retenção
Controlo Qualidade	C:\Company\BIOGERM-BK\SGQ-BK\LAB QUIM\AGUAS\Hidrocarbonetos	

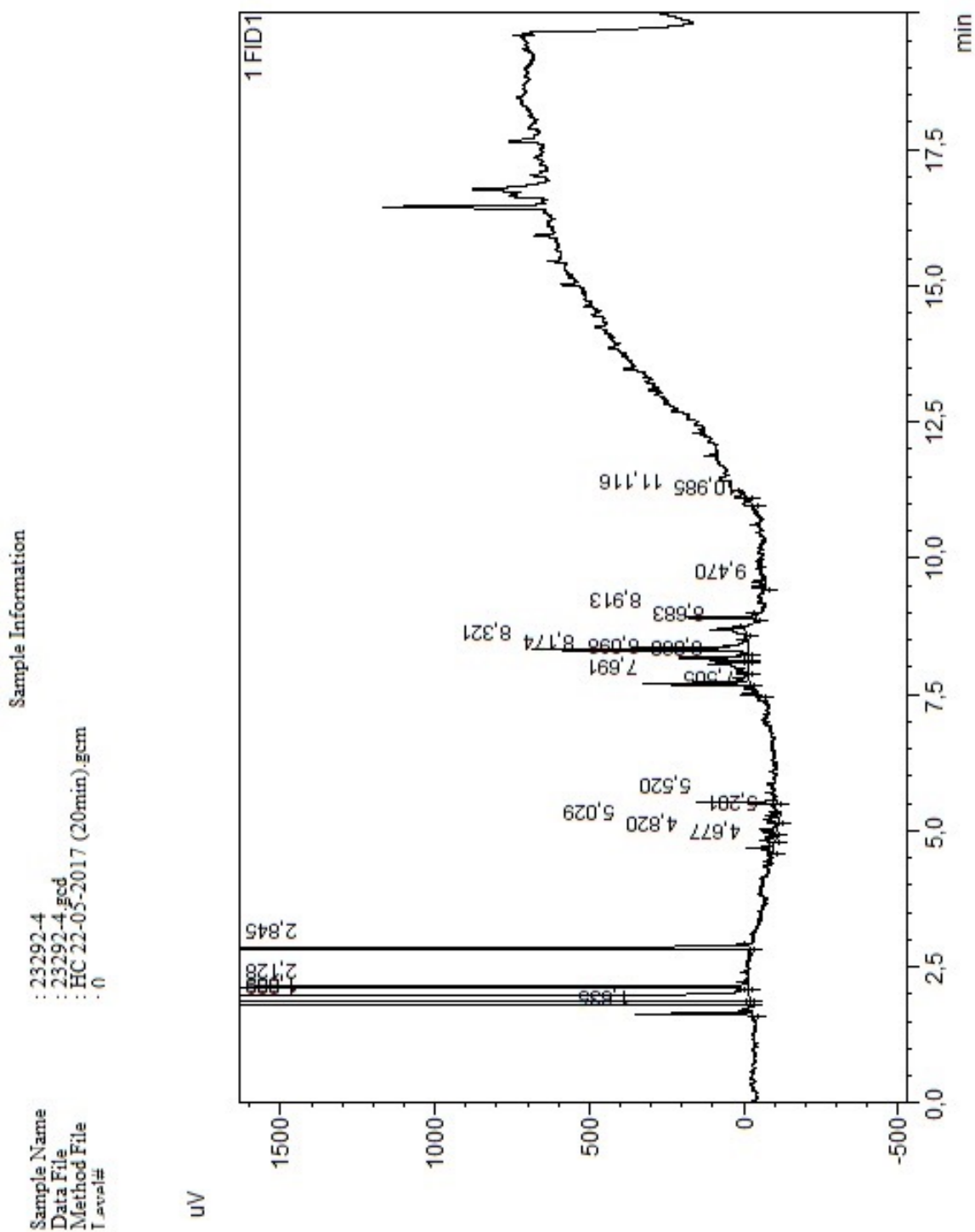
Anexo VI - Cromatograma de um branco com interferência de picos retidos da amostra analisada anteriormente



Anexo VII - Os cromatogramas apresentados permitem perceber a diferença entre uma amostra de diesel fresca (a vermelho) e após a passagem de algum tempo à temperatura ambiente (a azul). ⁴⁰



Anexo VIII - Cromatograma da amostra de água residual proveniente de uma fábrica produtora de produtos automóveis, utilizada no estudo de reprodutibilidade.



Anexo IX - Boletim proveniente do ISEP, com o valor de hidrocarbonetos (TPH) de uma amostra de água residual recolhida na caixa de visita de uma fábrica.

RELATÓRIO DE ENSAIO

BIOGERM, S. A.

PROCESSO Nº:

1720358

Rua da Estrada, 1060 - Crestins
4470-600 Moreira - Maia

RELATÓRIO DE ENSAIO Nº:

51702

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA					
A26/1720358	BG23292				
Classe de Amostra:	Água residual	Legislação Aplicável:		Legislação não definida	
Tipo de Amostragem:		Efetuada por:	Cliente		
Colheita:		Receção:	19/05/2017	Início da análise:	24/05/2017
Fim da análise:	31/05/2017			Emissão do Relatório:	31/05/2017

Este boletim não pode ser parcialmente reproduzido sem autorização por escrito dada pela direção do nosso Laboratório. Os resultados referem-se exclusivamente às amostras recebidas e ensaiadas. Qualquer extrapolação é da exclusiva responsabilidade do cliente.

PARÂMETRO	Valor Obtido	Unidade	Referência do Método	Método de Ensaio	Valor de Referência
Hidrocarbonetos	7	mg/L	CEA-PE026 (2016-11-28)	Gravimetria	N/A

Notas - O ensaio assinalado com * não está incluído no âmbito da acreditação; O ensaio assinalado com ** foi subcontratado a um laboratório com o parâmetro não acreditado e não está incluído no âmbito da nossa acreditação; O ensaio assinalado com *** foi subcontratado a um laboratório com o parâmetro acreditado e não está incluído no âmbito da nossa acreditação; Os resultados expressos na forma <X, na coluna designada "Valor Obtido", são inferiores ao limite de quantificação do método; A amostragem não está incluída no âmbito da acreditação; N/A - Não aplicável. Método interno equivalente é aquele que tem a mesma área de aplicação (parâmetros e matrizes) e que cumpre as características de desempenho, obtendo resultados comparáveis ao(s) método(s) normalizado(s) junto indicado(s).

SMEWW - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - 22ª Edição;
CEA-PEXXX - Código interno do método.

Observações:

Comentários:

A Diretora do Laboratório do CEA



Rosária Santos, Eng^a Química